



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA (FARMÀCIA)

PROGRAMA DE DOCTORAT: MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 2002-2004

**Influencia del contraión en las propiedades biológicas de
tensoactivos aniónicos derivados de la N^α,N^ε-dioctanoil
lisina: citotoxicidad y ecotoxicidad *in vitro***

Memòria presentada per Lourdes Sánchez Molina per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directores:

M. Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo

M. Rosa Infante Martínez-Pardo

Doctoranda:

Lourdes Sánchez Molina

2006

1. INTRODUCCIÓN

Parte I

1. Los tensioactivos: sustancias anfífilas con capacidad autoagregante

1.1. Definición de tensioactivo. Características generales

Un compuesto tensioactivo, también llamado **agente de superficie**, es una sustancia química que se adsorbe en las interfases¹ gas/líquido (aire-agua), líquido/líquido (aceite-agua) o gas/sólido (superficie de sólidos) (Attwood y Florence, 1983) y que a partir de una determinada concentración es capaz de formar agregados supramoleculares.

Los tensioactivos poseen en su estructura química dos regiones claramente diferenciadas, lo que les confiere el *carácter dual* característico de todas las sustancias anfífilas (Figura 1). Una es la **porción hidrófoba (o apolar)**, que presenta afinidad por disolventes orgánicos o apolares y corresponde frecuentemente a una cadena hidrocarbonada, de tipo alquilo o alquil benceno, de longitud variable. La otra es la **porción hidrófila (o polar)**, caracterizada por mostrar atracción hacia disolventes polares, sobre todo agua y puede estar formada por átomos de oxígeno, azufre, fosfato o nitrógeno, incluidos en grupos funcionales como alcoholes, tioles, éteres, ésteres, ácidos, sulfatos, sulfonatos, fosfatos, aminas, amidas, etc.

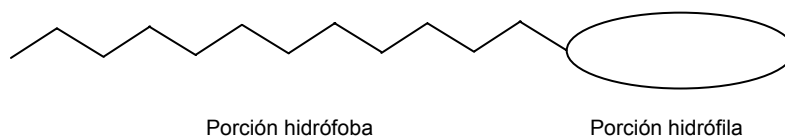


Figura 1. Esquema de un tensioactivo

La naturaleza dual (polar-apolar) de los tensioactivos y en particular el equilibrio entre las porciones hidrófoba e hidrófila de la molécula se conoce como **balance hidrófilo-lipófilo** (HLB, en sus siglas en inglés). El HLB es la característica responsable de los fenómenos de actividad superficial y de agregación supramolecular de los tensioactivos (micelas, cristales líquidos, liposomas, vesículas y geles). Esas características proporcionan a los tensioactivos sus numerosas aplicaciones y permiten el desarrollo de productos industriales (Rosen, 2004). No obstante, la innovación y el desarrollo industrial de nuevos tensioactivos radica fundamentalmente en el cumplimiento de las directrices medioambientales y de seguridad, así como en la necesidad de presentar beneficios multifuncionales.

¹ El término interfase expresa el límite entre dos fases condensadas no miscibles y el término superficie indica una interfase donde una fase es un gas, normalmente aire y la otra, una fase condensada (líquido o sólido).

1.2. Propiedades fisicoquímicas de las soluciones de tensioactivos

En disolventes polares como el agua, las moléculas de tensioactivo se distribuyen de manera que su concentración en la interfase líquido-gas y líquido-sólido es mayor que en el interior de la solución, de manera que sus grupos polares quedan orientados hacia la fase polar y los no polares o hidrófobos alejados de ésta (Figura 2):

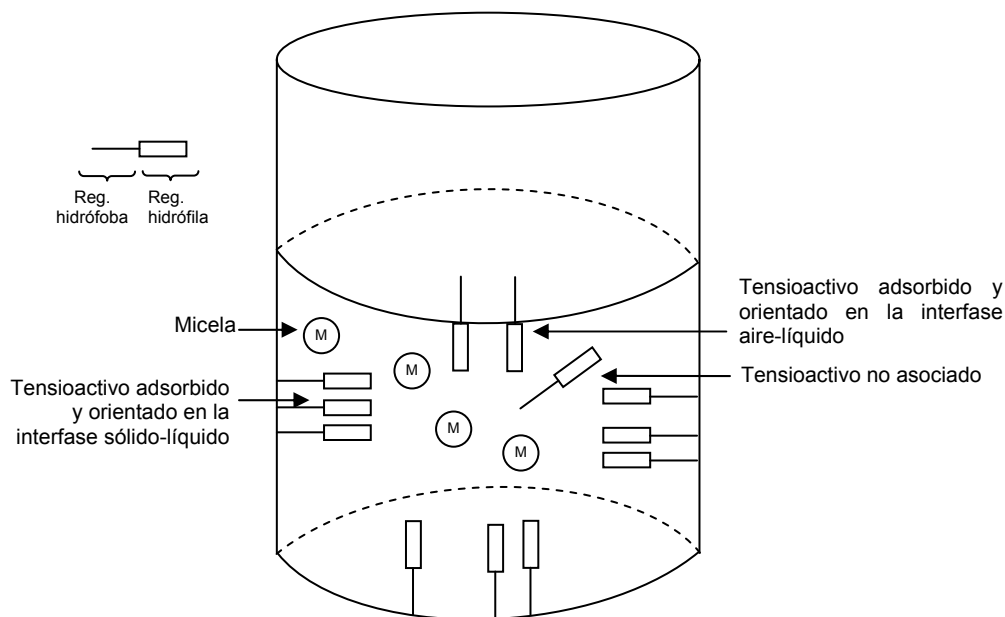


Figura 2. Distribución de las moléculas de tensioactivo en las interfases líquido-gas y líquido-sólido

La **tensión superficial** se define como la fuerza de atracción entre las moléculas de la superficie de un líquido y las moléculas por debajo de ellas. Este fenómeno tiene como principal efecto disminuir en lo posible la superficie del líquido para un volumen dado, de aquí que un líquido en ausencia de gravedad adopte la forma esférica, que es la que tiene una menor relación área-volumen (Rosen, 2004). En las superficies líquidas, intervienen fuerzas intermoleculares de tipo iónico, de Van der Waals y de tipo hidrofóbico.

El trabajo (W) requerido por unidad de área para incrementar el área de un líquido se denomina *tensión superficial* (γ) del líquido:

$$W = \gamma dA$$

Las unidades del sistema internacional para medir la tensión superficial son: fuerza por unidad de longitud (N/m) o energía por unidad de superficie (J/m^2), siendo las primeras las más utilizadas.

La adsorción de las moléculas de tensioactivo en las interfases o en las superficies que las contienen es debida, por un lado, a la débil interacción entre la parte hidrófoba del tensioactivo con las moléculas de agua y por otro, a la fuerte interacción (fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno) entre las propias moléculas de agua. Todo esto provoca la expulsión de la porción hidrófoba del tensioactivo fuera del seno de la solución acuosa. Además, la porción hidrófila del tensioactivo interacciona fuertemente con el agua a través de interacciones dipolo-dipolo o ión-dipolo, y como consecuencia queda solvatada. Por tanto, las moléculas de tensioactivo no se separan en otra fase sino que permanecen adsorbidas de manera ordenada en la interfase con la parte hidrófoba fuera del seno de la fase acuosa y la parte hidrófila solvatada.

La adsorción progresiva de las moléculas de tensioactivo en la superficie de la solución provoca un cambio en las fuerzas de interacción de las moléculas de agua de la superficie. Como consecuencia, el tensioactivo es capaz de disminuir la energía de los enlaces entre las moléculas de agua, es decir, de reducir la fuerza de tensión superficial del agua. A medida que aumenta la concentración de tensioactivo, aumenta el número de moléculas de tensioactivo en la superficie, disminuyendo la tensión superficial hasta alcanzar un valor crítico, llamado **concentración micelar crítica (CMC)**, a partir del cual, la tensión superficial se mantiene constante y se empiezan a formar agregados moleculares de tensioactivo o **micelas** en la solución (Berthod, 1983; Rosen, 2004), en equilibrio con los monómeros. A partir de la CMC, cualquier cantidad de tensioactivo que se añada a la solución se incorpora en forma de agregado y no de monómero.

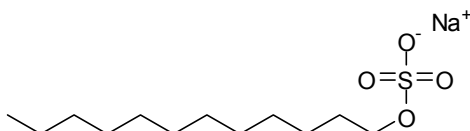
La determinación de la CMC, se puede realizar utilizando cualquier propiedad que presente un cambio más o menos brusco frente a la concentración de tensioactivo. Algunas de las propiedades más utilizadas son: la tensión superficial, la conductividad, y las propiedades ópticas y espectroscópicas tales como medidas de dispersión de la luz e índice de refracción o absorción (Tadros, 2005).

La formación de micelas es una característica importante de los tensioactivos ya que algunos procesos que se dan en las interfases, como la interacción de los tensioactivos con membranas biológicas, la hemólisis y la solubilización dependen de las micelas o agregados presentes en la solución (Evans y Wennerström, 1995; Adams y col., 2003; Ross y col., 2004; Dehghan-Noude y col., 2005). La formación de estos agregados no sólo tiene lugar en medio acuoso sino también en otros disolventes polares y no polares (Lattes, 1989; Auvrux y col., 1992). No obstante, debido al interés tanto industrial como biológico de los sistemas acuosos, la mayoría de investigaciones relacionadas con la formación de agregados supramoleculares de tensioactivos se realizan en medio acuoso.

1.3. Clasificación de los tensioactivos

Desde el punto de vista comercial, los tensioactivos se clasifican a menudo en función de su uso pero este tipo de clasificación no resulta muy adecuada y podría dar lugar a confusiones ya que muchos de ellos presentan diversas aplicaciones. La clasificación más aceptada científicamente se basa en su capacidad de disociación en agua ya que es el principal medio de aplicación de los tensioactivos. Se clasifican según la naturaleza de su grupo hidrófilo o polar (Porter, 1994; Effendy y Maibach, 1995; Salager, 2002) en:

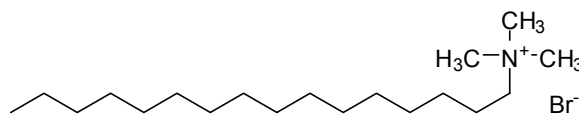
- **Aniónicos:** Son tensioactivos que se disocian en un anión anfífilo (responsable de la actividad superficial) y un contraión catiónico, que suele ser un metal alcalino (sodio, potasio, etc.) o un amonio cuaternario. Son los más utilizados como emulsionantes, solubilizantes, humectantes y detergentes. A este grupo pertenecen: tensioactivos sintéticos como los alquil benceno sulfonatos, los jabones (sales de sodio de ácidos grasos), los agentes espumantes como el dodecil sulfato sódico (SDS, en sus siglas en inglés), que es uno de los tensioactivos más utilizados, los humectantes del tipo sulfosuccinato, los dispersantes del tipo lignosulfonatos, etc. La producción de los tensioactivos aniónicos representa alrededor del 55 % de los tensioactivos producidos anualmente en el mundo. Las principales razones para su predominio en el futuro son las siguientes: excelente capacidad limpiadora en usos domésticos y en aplicaciones industriales, compatibilidad con los nuevos procesos de fabricación, flexibilidad en las formulaciones, bajo coste de fabricación, rápida y elevada biodegradabilidad y baja toxicidad acuática constituyen (Piasecki, 2002). Los tensioactivos sintetizados y estudiados en esta Tesis corresponden a este tipo.



Dodecil sulfato sódico (SDS)

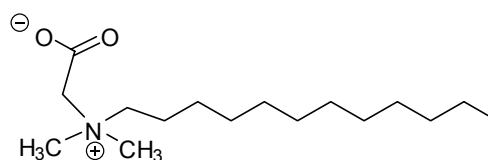
- **Catiónicos:** Se disocian dando lugar a un catión anfífilo y un contraión aniónico, que suele ser un halogenuro. La gran mayoría de tensioactivos catiónicos son compuestos nitrogenados tales como sales de amonio y sales de amonio cuaternario. Estos tensioactivos son en general más costosos que los aniónicos y los no iónicos debido al número y tipo de reacciones necesarias para su síntesis. Como consecuencia, sólo se utilizan en aplicaciones específicas: como antimicrobianos naturales o sintéticos de uso externo o como agentes de adsorción sobre sustratos biológicos inertes con carga negativa (Zografí y col., 1990; Pérez y col., 2002; Haldar y col., 2005). Esta última propiedad hace que sean excelentes agentes antiestáticos, suavizantes para el cabello e inhibidores de la corrosión. También se pueden utilizar como desinfectantes de heridas en

la piel y para la desinfección de material quirúrgico (Yanai y col., 2006). Entre los tensioactivos catiónicos más comunes se encuentran el cloruro de benzalconio y el bromuro de hexadecil trimetilamonio (HTAB, en sus siglas en inglés).



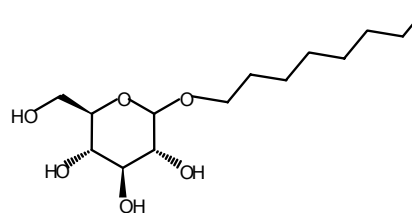
Bromuro de hexadecil trimetilamonio (HTAB)

• **Anfóteros:** Estos tensioactivos dan lugar tanto a disociaciones aniónicas como catiónicas en función del pH de la solución y pueden poseer las propiedades solubilizantes de los aniónicos y las desinfectantes de los catiónicos. Este es el caso de productos sintéticos como las betaínas o las sulfobetaínas y sustancias naturales como los aminoácidos y los fosfolípidos. En general, los tensioactivos anfóteros son tan caros como los catiónicos y por esta razón su utilización se reduce a aplicaciones en sectores específicos como los productos cosméticos (Rushton y col., 1994; Guin, 2000) y en champús para bebés (Reynold, 1993), donde su elevada biocompatibilidad y baja toxicidad son primordiales.



N-dodecil trimetil amino betaína

• **No iónicos:** Estos tensioactivos no se ionizan en solución acuosa ya que su grupo hidrófilo (alcohol, fenol, éter, éster o amida) no se puede disociar y por tanto, no se ven afectados por el pH de la solución. Una gran proporción de estos tensioactivos son hidrofílicos por la presencia de una cadena de polietilenglicol (alcoholes etoxilados) o de polisacárido (alquil poliglucósidos). Representan aproximadamente el 40 % de la producción mundial y son poco tóxicos. Son muy utilizados en preparaciones farmacéuticas (Kolodziejska, 2005; Vyas y col., 2005) y en la industria cosmética (limpiadores, champús) y como emulsionantes y solubilizantes en los alimentos (Rosen, 2004; Golemanov y col., 2006).



Octil glucósido

1.4. La evolución de los tensioactivos a lo largo del tiempo

El jabón, desarrollado por las antiguas civilizaciones del Mediterráneo, fue el primer agente tensioactivo conocido para la limpieza de la piel, pero hasta principios del siglo XIX no se convirtió en el más utilizado. Su acción principal es la de facilitar el mojado de la piel por parte del agua y la eliminación de partículas de suciedad y bacterias presentes en la superficie de la piel. La grave escasez de jabón en Alemania después de la 1ª Guerra mundial junto con su baja efectividad en aguas duras o ácidas, supuso un incentivo para el desarrollo de sustitutos sintéticos del jabón (Kirk-Othmer, 1994). Uno de los primeros procesos para la síntesis del tensioactivo aniónico SDS, se describió en Alemania hace unas 7 décadas (Löttermoser y Stoll, 1933). Fue así como empezó el desarrollo de formulaciones más elaboradas hacia los años 30 y 40 con la aparición de nuevos detergentes sintéticos.

Desde finales de los años 40, los tensioactivos sintéticos se han ido utilizando cada vez más en formulaciones de productos de limpieza tanto para el consumidor como para la industria, siendo los tensioactivos aniónicos los más utilizados (Ainsworth, 1992). A modo de ejemplo, es interesante mencionar que datos recientes en Estados Unidos indican que los tensioactivos aniónicos representan en la actualidad entre un 43 % y un 67 % de los componentes utilizados en el hogar, en el cuidado personal y en formulaciones industriales.

La evolución cualitativa del mercado en los últimos 50 años ha sido muy significativa. En el año 1940, la producción mundial de tensioactivos era de 1,6 MT (millones de toneladas) y consistía esencialmente en jabones (sales de ácidos grasos), producidos mediante una tecnología muy antigua. A finales de la 2ª Guerra Mundial, el mercado del refinamiento del petróleo proporcionaba olefinas de cadena corta (2 ó 3 átomos de carbono), en particular propileno, como subproducto derivado de la transformación de diversas fracciones del petróleo y que, en aquel entonces, no tenían aplicación. En los años 50, el propileno no tenía ningún uso potencial mientras que el etileno empezaba a emplearse en la fabricación de estireno. El bajo coste del propileno y la posibilidad de polimerizarlo para producir grupos hidrófobos de 9, 12 y 15 átomos de carbono supusieron una alternativa muy económica a los grupos alquílicos procedentes de ácidos grasos naturales o sintéticos. Así aparecieron los detergentes sintéticos del tipo alquil benceno sulfonatos (ABS) que pronto reemplazaron a los jabones para lavadoras y para otros usos domésticos. El desarrollo del *vapocraqueo*² en los años 50, esencialmente para fabricar etileno como materia prima para polímeros diversos, ha contribuido a la disponibilidad a bajo coste de este intermediario en la producción de óxido de etileno, el elemento básico para sintetizar tensioactivos no iónicos. Este hecho ha permitido la

² Proceso de transformación de determinadas fracciones del petróleo en otras más ligeras por efecto combinado de la temperatura, la presión y a veces un catalizador.

aparición en el mercado de estos tensioactivos, cuyo grupo hidrófilo es una cadena de polioxietiléneter formada por policondensación de óxido de etileno (Salager, 2002).

En la década de los 60, muchos ríos y lagos que recibían las aguas de deshecho procedentes de las grandes ciudades empezaron a cubrirse de espumas persistentes que ocasionaron un daño ecológico considerable ya que la gruesa capa de espuma reducía la fotosíntesis y la disolución del oxígeno en el agua. El culpable de esta situación fue la *ramificación de la cadena alquilica*³ de los ABS, formada por grupos propileno polimerizados. Se descubrió que dichas ramificaciones eran las responsables de la resistencia a la biodegradación. Como consecuencia de las leyes de protección del medioambiente, alrededor de 1965, se comenzó a restringir y prohibir el uso de ABS ramificados derivados de propileno en la fabricación de los detergentes sintéticos tanto en Europa como en Estados Unidos.

Los fabricantes de tensioactivos tuvieron entonces que buscar nuevas materias primas un poco más costosas como los alquilatos lineales y también nuevos métodos, como por ejemplo la polimerización del etileno o la extracción por tamiz molecular. Las nuevas vías de síntesis resultaban muy caras pero esta situación favoreció el desarrollo de nuevas moléculas, que ha dado lugar a la amplia variedad de productos que existen en la actualidad. Aunque los alquil benceno sulfonatos lineales (LAS) siguen siendo detergentes económicos, la diferencia respecto a otros tipos de tensioactivos se reduce (Salager, 2002).

Los años 70 supusieron una proliferación de nuevas fórmulas químicas y también un incremento elevado y diverso de la utilización de tensioactivos en aplicaciones industriales y domésticas. Además, la producción de jabones y su utilización en productos industriales y cosméticos aumentó rápidamente. En los años 80 y 90, la cuota de mercado de los diferentes productos se estabilizó, con un rápido incremento de los tensioactivos no iónicos respecto a los aniónicos y en particular, debido a la introducción de un nuevo tipo de tensioactivos no iónicos: los alquil poliglucósidos (APG).

La tasa anual de mercado a escala mundial para detergentes y productos de limpieza con tensioactivos en su composición es de aproximadamente 60×10^9 €, hecho que demuestra la importancia comercial de dichas aplicaciones (Tabla 1). La producción mundial de jabones, detergentes y otros tensioactivos en el 1970 era de aproximadamente 18 MT; en 1990, de 25 MT; y en el 2000, de 40 MT, sin tener en cuenta los tensioactivos poliméricos. Algo menos de un 25 % de la producción mundial corresponde al mercado estadounidense y un 25 % al mercado europeo (Atwood y Steed, 2004).

³ Los grupos alquílicos se forman al añadir uno o más grupos alquilo a un compuesto.

Tabla 1. Situación del mercado de diferentes tensioactivos (adaptado de Holmberg, 2003)

33 % Jabones, carboxilatos, lignosulfonatos, donde:
50 % jabones para uso doméstico
35 % otros ácidos para uso industrial
22 % Detergentes sintéticos de tipo sulfonato o sulfato, donde:
50 % uso doméstico (en polvo, líquidos)
17 % industria del petróleo
7 % aditivos concretos
4 % agro-alimentos
3 % cosméticos, productos farmacéuticos
40 % No iónicos, alcoholes etoxilados o sulfatos oxietilenados, donde:
40 % alcoholes etoxilados
20 % alquil fenol etoxilados (en rápida regresión)
15 % ésteres de ácidos grasos
10% derivados de aminas o amidas
4 % Catiónicos, sobre todo sales de amonio cuaternarias
1 % Anfóteros, sobre todo betaínas y derivados de aminoácidos

La evolución del mercado en los últimos 50 años se debe a tres factores principales. El primero es el avance tecnológico, es decir, el descubrimiento de nuevas sustancias y el desarrollo técnico-económico subsiguiente. El segundo, la biocompatibilidad y seguridad de estos compuestos y el tercero, de gran valor comercial, la disponibilidad de materia prima.

Actualmente, el mercado de tensioactivos presenta una gran variedad tanto desde el punto de vista de la estructura química de las moléculas como de su origen y coste. Las materias primas utilizadas tienen orígenes diversos y su transformación puede seguir, dependiendo del caso, un proceso simple (hidrólisis) o bien procesos más sofisticados y complejos (químicos, enzimáticos o biotecnológicos).

De una manera sencilla, podemos clasificar las **materias primas** utilizadas en la fabricación de tensioactivos, en petroquímicas o no renovables (la gran mayoría) y en naturales o renovables. Entre las materias primas renovables más utilizadas en la producción de tensioactivos se pueden destacar (Salager, 2002):

- Aceites y grasas naturales animales y vegetales, de las cuales la gran mayoría son triglicéridos.
- Otras sustancias naturales: aceites extraídos de la madera, ligninas y derivados.
- Carbohidratos y polioles (compuestos con varios grupos hidroxilo) derivados de plantas (glicerol, azúcares de la remolacha y caña de azúcar), proteínas y sus hidrolizados derivados de caseína, colágeno, queratina, y aminoácidos.

1.5. Tensioactivos derivados de aminoácidos

El empleo de los aminoácidos como materias primas para la síntesis de nuevos tensioactivos fue reconocido tan pronto como fueron descubiertos. Los lipoaminoácidos son moléculas anfífilas que contienen un aminoácido como porción hidrófila y al menos una cadena larga, generalmente hidrocarbonada, como porción hidrófoba. Constituyen una interesante alternativa a los tensioactivos sintéticos convencionales ya que presentan multifuncionalidad, biodegradabilidad y baja toxicidad y sus materias primas proceden de fuentes renovables (Pérez y col., 2002; Morán y col., 2001a, 2004; Mitjans y col., 2003; Benavides y col., 2004a, 2004b; Martínez y col., 2006).

Hacia el año 1990, los tensioactivos derivados de aminoácidos tan sólo representaban un 1 % pero sin duda este valor ha ido creciendo en los últimos años debido a las últimas tendencias e investigaciones que se han llevado a cabo al respecto (Infante y col., 1992; Infante y col., 1997; Morán y col., 2001a, 2001b; Pérez y col., 2002; Metselaar y col., 2003; Soo y col., 2003; Roy y col., 2005).

Dado que los agentes tensioactivos pueden ser perjudiciales para el medio acuático, su biodegradabilidad y biocompatibilidad ha llegado a ser tan importante como su funcionalidad. No ha sido hasta el último cuarto del siglo XX cuando ha surgido la preocupación por parte de los fabricantes por desarrollar tensioactivos más ecológicos debido a la presión de los consumidores. Especialmente los derivados de productos naturales como el azúcar (p.ej. alquil poliglucósidos) fueron ampliamente desarrollados en la pasada década en busca de propiedades biodegradables y biocompatibles.

Una interesante y práctica estrategia para minimizar la toxicidad e impacto medioambiental de los tensioactivos, consiste en la preparación de compuestos cuya estructura molecular resulta análoga a la de los tensioactivos naturales: lipoaminoácidos, fosfolípidos y glicerolípidos, todos ellos presentes en las membranas celulares de los organismos vivos (Holmberg, 2003).

1.5.1. Clasificación de los tensioactivos derivados de aminoácidos

La combinación de péptidos o aminoácidos polares en la región hidrófila y de cadenas hidrocarbonadas de longitud variable (de 8 a 16 átomos de carbono) para formar compuestos con estructura anfífila ha dado lugar a moléculas con elevada capacidad tensioactiva. La amplia diversidad de estructuras con aminoácidos o péptidos y la variedad de residuos grasos presentes en su estructura explican su multiplicidad estructural y sus diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Los principales tipos de tensioactivos derivados de aminoácidos (Figura 3) son (Morán y col., 2004):

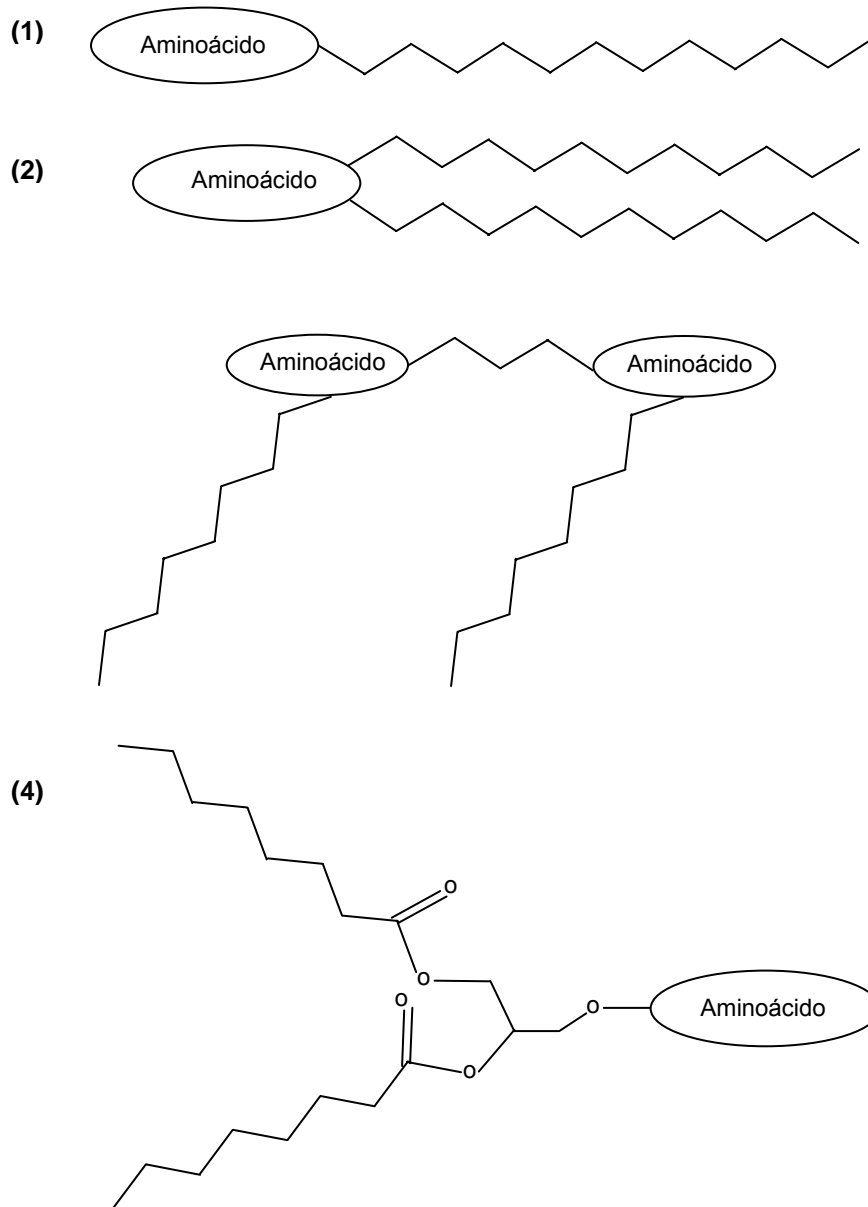


Figura 3. Estructuras de los tensioactivos derivados de aminoácidos: (1) Lineales, (2) de Doble cadena, (3) Diméricos, (4) Glicerolípidos

1. Lineales: Consisten en un aminoácido (cabeza polar) unido a una cadena hidrocarbonada. Son los más conocidos y utilizados comercialmente. Pueden ser de tipo acil-aminoácido, N-alquil amida y O-alquil éster (Infante y col., 1997). Cabe destacar los aniónicos del tipo *N^α-acil aminoácido* (Infante y col., 1992), que se pueden obtener mediante reacción de condensación de un ácido graso con el grupo α -amino de un aminoácido neutro o ácido. Las sales derivadas de *N^α-acil aminoácidos* se han extendido en el área de los detergentes, los cosméticos, los productos farmacéuticos y la alimentación debido a la simplicidad de su estructura, sus buenas propiedades de superficie y antimicrobianas, el leve efecto irritante en la piel y su elevada biodegradabilidad (Than y col., 1985; Macián y col., 1996; Infante y col., 1997).

2. De doble cadena: Están formados por un aminoácido unido a dos cadenas hidrocarbonadas. A este tipo pertenecen los tensioactivos no iónicos polioxietilenados derivados de lisina (Seguer y col., 1994), ácido glutámico y aspártico (Allouch y col., 1996) y también los tensioactivos aniónicos derivados de lisina (Vives y col., 1999) objeto de estudio de esta Tesis.

3. Diméricos (*Gemini*): Son estructuras formadas por dos aminoácidos (cabezas polares) y dos cadenas hidrocarbonadas unidas entre sí mediante una cadena espaciadora. Estos tensioactivos dan lugar a sistemas biodegradables de una extraordinaria capacidad de adsorción y agregación (Rosen, 1993; Zana, 1997; Pérez y col., 1996, 2002).

4. Glicerolipídicos: Consisten en una cabeza polar de aminoácido y una o dos porciones hidrófobas unidas a un esqueleto de glicerol y se consideran análogos de monoglicéridos, diglicéridos y fosfolípidos (Rosen, 1993; Zana, 1997). Se han sintetizado compuestos derivados de la condensación de mono y diacilglicéridos puros con aminoácidos del tipo arginina, lisina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina, asparagina y tirosina. Sus propiedades emulsionantes y encapsulantes (formadores de vesículas) les hacen candidatos de primera línea para su aplicación en preparados cosméticos y alimentarios (Morán y col., 2001a, 2001b).

En función del tipo de aminoácido, cada uno de estos grupos a su vez se puede clasificar en tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos.

1.5.2. Tensioactivos derivados del aminoácido lisina

Los tensioactivos no iónicos polioxietilenados de doble cadena derivados de lisina, del tipo *N^α,N^ε-diacil lisina* fueron sintetizados y estudiados por primera vez (Seguer, Tesis; Seguer y col., 1994) con el fin de desarrollar tensioactivos no tóxicos de estructura análoga a la de las lecitinas naturales para su aplicación en el campo farmacéutico, alimentario y biológico (Macián y col., 1996). Se sintetizaron homólogos de diferente

longitud de cadena alquílica y diferente número y longitud de cadena oxietilenada. El más eficaz de todos ellos fue el tensioactivo 77K22, que se muestra en la siguiente figura:

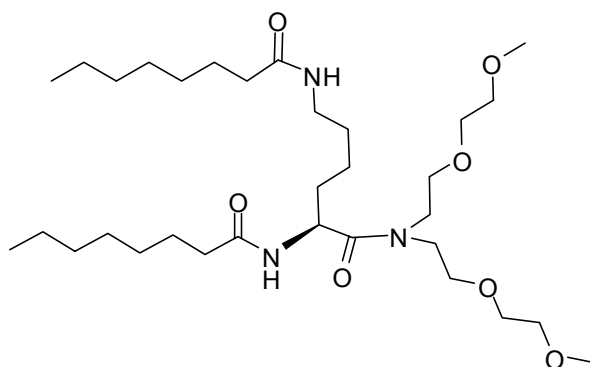


Figura 4. Esquema del compuesto 77K22

Los tensioactivos formados por dos cadenas hidrófobas resultan más eficaces cuando se comparan con los tensioactivos lineales convencionales. Este hecho se debe a que la presencia de dos cadenas hidrófobas en la misma molécula refuerza la interacción hidrofóbica inter o intracadena contribuyendo de una manera positiva a las propiedades superficiales y micelares del tensioactivo (Rosen, 1993; Zhu, 1991). Más adelante, y a partir de estos compuestos no iónicos derivados de lisina, se sintetizaron tensioactivos aniónicos de doble cadena como sales del tipo N^{α},N^{ϵ} -diacil lisinatos (Macián y col., 1996; Vives y col., 1999). Estudios previos, han demostrado que tanto los tensioactivos no iónicos como los aniónicos derivados de la N^{α},N^{ϵ} -diacil lisina, además de presentar excelentes propiedades superficiales, son menos hemolíticos y menos irritantes que los comerciales (Macián y col., 1996; Vives y col., 1997, 1999).

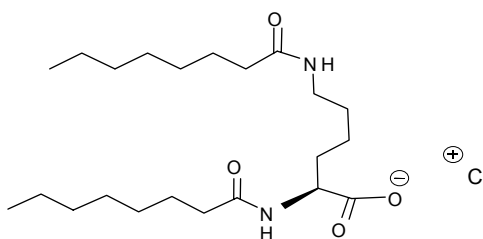
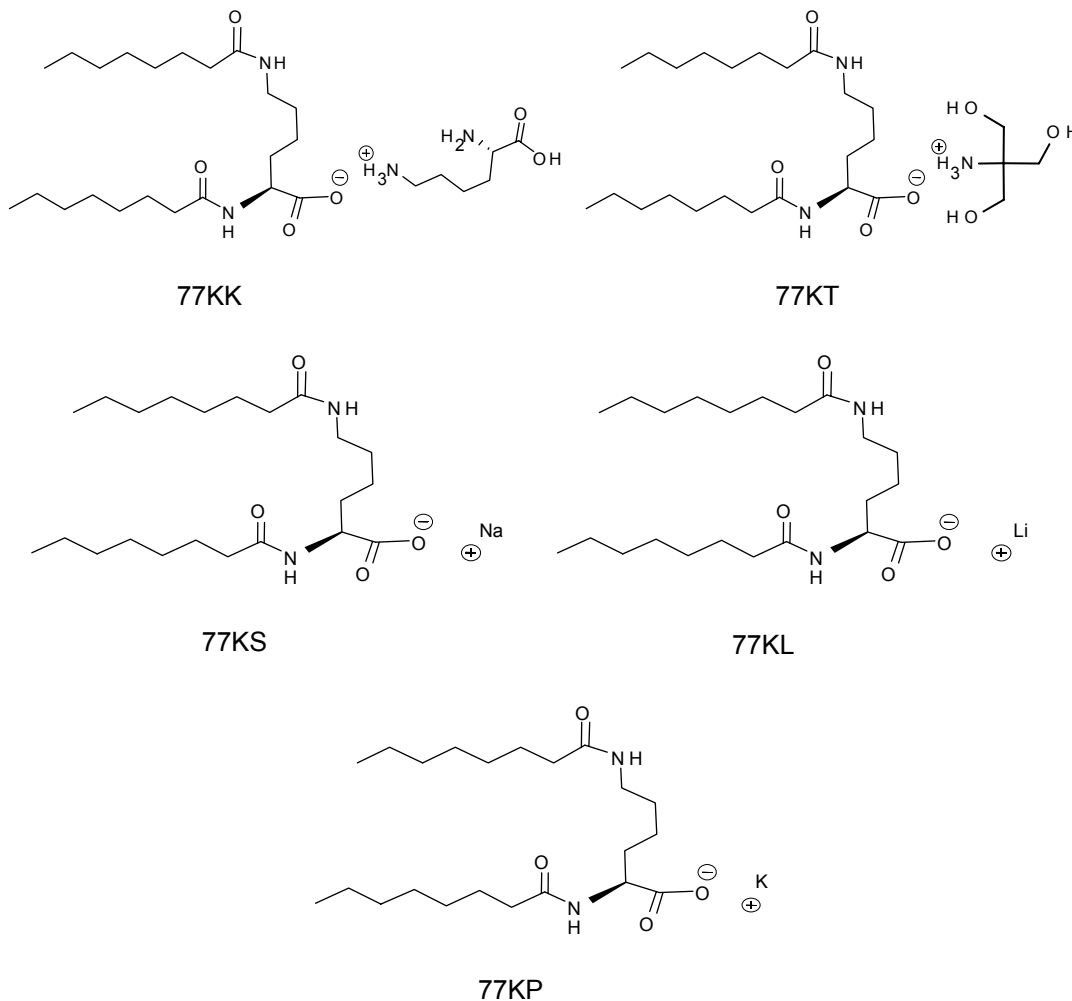


Figura 5. Esquema de las sales de N^{α},N^{ϵ} -dioctanoil lisina. La letra C simboliza el contraión

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los tensioactivos aniónicos derivados del aminoácido lisina son de gran interés debido a sus propiedades biodegradables, propias de los tensioactivos derivados de aminoácidos, y a su baja actividad hemolítica demostrada en estudios anteriores. Por tanto, en esta Tesis, se ha estudiado una familia de lipoaminoácidos de doble cadena: las sales derivadas de N^{α},N^{ϵ} -dioctanoil lisina (77K). Dicha familia comprende 5 tipos de sales: la sal de lisina (77KK), la

de tris(hidroximetil) amino metano (77KT), la de sodio (77KS), la de litio (77KL) y la de potasio (77KP)⁴, representadas a continuación:



Estos tensioactivos tienen la siguiente estructura:

- Una parte hidrófoba: formada por la condensación de dos cadenas de ácidos grasos saturados de 8 átomos de carbono con los grupos α -amino y ϵ -amino de la lisina y representada en la nomenclatura por 77K, donde “77” indica las dos cadenas alquílicas (el número 7 indica los grupos metileno de la cadena pero sin contar el grupo carbonilo del ácido graso) y la letra K, la lisina.
- Una parte hidrófila: formada por el aminoácido lisina, cuyo grupo carboxilo está ionizado en forma de sal aniónica, y el correspondiente contraión catiónico.
- Diferentes contraiones: estos pueden ser orgánicos y voluminosos, como los cationes lisina (K) y tris(hidroximetil) amino metano (T) o inorgánicos y pequeños, como los cationes sodio (S), litio (L) y potasio (P).

⁴ Los símbolos del sodio, litio y potasio han sido adaptados excepcionalmente para una mayor comprensión de esta tesis. El potasio se ha representado con la letra P para no confundirlo con la lisina, denominada con la letra K en el sistema internacional de abreviaciones.

Parte II

2. Riesgos que comporta el uso de tensioactivos y su evaluación

Hoy en día el uso de tensioactivos es prácticamente indispensable debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones. Además de los productos de limpieza personal, los cosméticos y los productos para el cuidado dermatológico, donde el producto por su forma de aplicación entra en contacto con la piel, otros productos como detergentes para lavavajillas y para la colada, pesticidas y pinturas también contienen tensioactivos (Tabla 2). Como consecuencia de ello, la exposición de la piel, ojos y mucosas a productos que contienen tensioactivos es constante y puede provocar irritación ocular, dérmica u otras reacciones adversas (Effendy y Maibach, 1995, 1996; Barany y col., 1999; Mitjans y col., 2003; Nicander y col., 2003; Benavides y col., 2004a, 2004b; Martínez y col., 2006). También es importante asegurar la inocuidad de dichos compuestos frente al medio ambiente ya que muchos de ellos acabarán formando parte del ecosistema una vez sean desechados.

La capacidad de los tensioactivos para adsorberse y unirse a las interfases provoca efectos sobre los ojos y la piel, que pueden ser tanto nocivos como beneficiosos y dependen de diversos factores: concentración de tensioactivo, tipo de exposición, tiempo de contacto y respuestas individuales.

Tabla 2. Principales tensioactivos utilizados en productos de limpieza

Producto	Tipo de tensioactivo	% presente en la formulación
Detergente líquido para la colada	Aniónicos: p.ej. alquil benceno sulfonatos, alquil éter sulfatos etoxilados, jabones	5-30 %
	No iónicos: p.ej. alcoholes grasos oxietilenados	5-10 %
Lavavajillas líquido	Aniónicos:p.ej. alquil benceno sulfonatos, alquil sulfonatos, olefin sulfonatos, alquil sulfatos, alquil éter sulfatos etoxilados	10-40 %
Limpiadores multiusos	Aniónicos: p.ej. alquil benceno sulfonatos, alquil sulfonatos, jabones, alquil sulfatos, alquil éter sulfatos etoxilados	1-10 %
	No iónicos: p.ej. alquilfenil éteres oxietilenados, alcoholes grasos oxietilenados	1-10 %
Champú	Aniónicos: p.ej alquil éter sulfatos etoxilados	12-16 %
	Anfóteros: p.ej. cocoamidopropil betaínas	2-5 %
	No iónicos: p.ej. ácidos grasos oxietilenados	0-2 %

Para garantizar la inocuidad de los productos utilizados es preciso disponer de tensioactivos que presenten baja toxicidad, que sean poco irritantes y respetuosos con el medio ambiente. Durante los procesos de cribado también es necesario establecer métodos rápidos para evaluar la toxicidad de dichos compuestos. En vistas de posibles

aplicaciones de los tensioactivos estudiados en esta Tesis, la valoración de su toxicidad resulta crucial para garantizar la seguridad en su utilización.

La evaluación del potencial irritante de nuevos productos e ingredientes, generalmente, se realiza antes en animales que en humanos. Este hecho permite obtener una información aproximada respecto a lo que ocurriría en la exposición en el hombre, evitando así provocar lesiones severas en piel y ojos de sujetos voluntarios.

De acuerdo con las regulaciones de la Unión Europea (UE), todos los compuestos químicos ya existentes o nuevos en el mercado tienen que ser evaluados desde el punto de vista toxicológico, incluyendo la evaluación de la irritación ocular, dérmica y medioambiental. La Comisión ha propuesto un nuevo marco regulador en la UE para el *Registro, Evaluación y Autorización de los Compuestos químicos (REACH)* con fecha del 29 de Octubre de 2003, con el propósito de mejorar la protección de la salud humana y medioambiental mediante una mejor y más rápida identificación de las propiedades de las sustancias químicas (Combes y col., 2006; Doe y col., 2006; Grindon y Combes, 2006; Ruden y Hansson, 2006). Al mismo tiempo, se debería fomentar la capacidad de innovación y competitividad de las industrias químicas de la UE. La propuesta del REACH confiere mayor responsabilidad a la industria para controlar los riesgos de las sustancias químicas y proporcionar información sobre su seguridad. Los fabricantes e importadores tendrán que recoger información sobre las propiedades de sus sustancias, que les ayudarán a controlar su seguridad y registrar la información en una base de datos central. La Agencia de Compuestos Químicos actuará como el punto central en el sistema REACH, de manera que activará las bases de datos necesarias para gestionar el sistema, coordinar la evaluación minuciosa de sustancias químicas sospechosas y ejecutar una base de datos pública en la que los consumidores y profesionales puedan encontrar información (Balls, 2006; Hengstler y col., 2006).

El objetivo principal de los estudios toxicológicos es proteger al ser humano frente a posibles efectos adversos de diversas clases de compuestos químicos, incluyendo compuestos farmacéuticos, cosméticos, productos de limpieza, industriales y agroquímicos. La exposición puede ser incidental, accidental o intencionada, como en el caso de los cosméticos y algunos medicamentos. Tradicionalmente, estos estudios de irritación se han realizado en conejos, mediante el ensayo conocido como *ensayo de Draize* (Draize y col., 1944). Draize y sus colaboradores desarrollaron protocolos estandarizados para evaluar la toxicidad dérmica y ocular mediante la valoración de los efectos de exposiciones agudas, intermedias y crónicas de compuestos químicos aplicados en la piel y ojos de conejos. Actualmente, la evaluación de la seguridad preclínica final de un compuesto se basa en la experimentación en animales. La búsqueda de métodos alternativos, que podrían usarse para reemplazar totalmente los ensayos en animales, ha sido el objetivo principal de la investigación toxicológica en los últimos años,

tanto por razones éticas y científicas como económicas (Balls y col., 1995; Gettings y col., 1996; Worth y Balls, 2002; Gartoff, 2005). Debido a la creciente preocupación social respecto al uso de animales de experimentación y en vistas de su posible prohibición en el futuro, tal como ha sucedido en la evaluación toxicológica de cosméticos, se hace necesario desarrollar y fomentar métodos alternativos *in vitro*. Según el Real Decreto 209/2005 sobre productos cosméticos, queda prohibida tanto la puesta en el mercado de productos testados en animales así como la realización de ensayos en animales, de los productos cosméticos cuya formulación final o cuyos ingredientes o combinaciones hayan sido objeto de ensayos en animales mediante la utilización de un método diferente a uno alternativo después de que este haya sido validado y adoptado en la Unión Europea (RD 209/2005, BOE núm. 49).

La idea de utilizar métodos alternativos a la experimentación animal surgió alrededor de los años 60 y desde entonces se han propuesto varias alternativas. El **principio de las 3Rs** -reducción, refinamiento y reemplazo- fue introducido por Russel y Burch en 1959 (Russel y Burch, 1959). De acuerdo con este principio podemos distinguir tres tipos de alternativas: alternativas de reducción, que reducen el número de animales necesarios para realizar un ensayo determinado o un grupo de ensayos; alternativas de refinamiento, en las cuales, el dolor, estrés y molestias experimentadas por los animales de laboratorio se minimizan mediante la mejora del diseño y/o la eficiencia de la técnica, y alternativas de reemplazo, que eliminan completamente la necesidad de animales. En 1986, estos principios fueron además incluidos en la Directiva Europea 86/609/EEC para controlar el empleo de animales en experimentos que los utilizan (EEC, 1986; Louhimies, 2002). Este principio ha permitido el desarrollo de directrices para llevar a cabo investigación básica y aplicada, poniendo en práctica los procedimientos de control y garantía de calidad y llevando a cabo evaluaciones preclínicas y medioambientales.

Los **métodos *in vitro*** han sido desarrollados para cubrir la mayoría de áreas de toxicología, incluyendo toxicidad aguda, irritación local, mutagénesis, etc. y constituyen una herramienta muy valiosa en las industrias cosmética y farmacéutica. Son relativamente económicos en comparación con los estudios realizados en animales y también resultan de gran utilidad, no solo para establecer clasificaciones de compuestos químicos a través de la determinación de su toxicidad sino también para estudiar los mecanismos de acción responsables de los efectos adversos (Pappinen y col., 2005). Otra ventaja de las pruebas *in vitro* es la rapidez con la que se pueden realizar (a menudo con varios compuestos químicos a la vez) y en muchos casos la facilidad con que se aplican los criterios de valoración. Además, permiten detectar pequeñas diferencias entre los compuestos ligeramente irritantes y así, el proceso de selección de compuestos químicos para el desarrollo de nuevos productos es más rápido y eficiente (Osborne y Perkins, 1994; Martínez y col., 2006).

Como resultado de las posturas sociales surgidas en torno a la ética en la experimentación animal, muchas industrias y laboratorios de investigación también han desarrollado programas de evaluación *in vitro*. El uso de métodos *in vitro* como ensayos de cribado es muy amplio en la industria, ya que muchos de ellos han demostrado funcionar de manera adecuada en la misma (LeClaire y de Silva, 1998). Se calcula que cada año miles de nuevos productos y sustancias se evalúan con éxito a escala mundial utilizando métodos alternativos, aunque sólo una pequeña parte de los resultados han sido publicados (Curren y Harbell, 2002).

A pesar de las numerosas ventajas de los métodos *in vitro*, actualmente, no existe ninguna alternativa que vaya a sustituir los múltiples usos del ensayo de Draize. Generalmente, se considera que un conjunto de métodos *in vitro*, capaces de imitar varios mecanismos de la irritación, son necesarios para completar el reemplazo del ensayo de Draize (Worth y Balls, 2002) y pueden proporcionar mucha información acerca de la toxicidad de los compuestos.

Aunque es cierto que el deseo de desarrollar métodos alternativos a la experimentación animal está en parte propiciado por las consideraciones relativas a la protección de animales, también es una necesidad obligada desarrollar mejores métodos, más avanzados científicamente y que se basen en los mecanismos de acción de los productos para proporcionar información relevante en la predicción y evaluación de los riesgos a que está sometido el hombre y para garantizar la protección del medio ambiente.

2.1. Irritación ocular

El **ojo** puede ser dañado debido a su exposición constante al ambiente externo y por eso, resulta vulnerable al ataque de cualquier agente físico o químico que pueda ocasionar alteraciones, daño o pérdida de la visión según el grado de severidad que cause. También puede entrar en contacto con productos cosméticos y sus ingredientes, o incluso de manera accidental, con productos de una manera diluida durante su uso normal (por ejemplo, champús). Por tales motivos, resulta esencial estimar lo más rigurosamente posible el potencial efecto irritante de cualquier compuesto químico que forme parte de productos que puedan entrar en contacto con los ojos y sus estructuras adyacentes (Wallace, 2001) para garantizar su seguridad y que no provoquen lesiones a este nivel.

El ojo es un órgano muy complejo en el que se pueden diferenciar: fotorreceptores (conos y bastones) en la retina, que son los encargados de establecer conexiones con el sistema nervioso central a través de los nervios ópticos; estructuras ópticas (córnea, iris, humor acuoso, lentes y humor vítreo); sistemas protectores (pestañas, sistema lacrimal y respuesta somato-sensorial de la córnea), y elementos nutricionales (vasos sanguíneos).

Todas las funciones oculares se encuentran en un balance delicado y cualquier lesión traumática, química o física puede afectarlas, creando un desorden de la visión y según cual sea su alcance incluso pérdida parcial o total de ésta (Wallace, 2001).

La irritación del ojo inducida por sustancias químicas comprende la exposición directa de estructuras como la córnea, el iris y la conjuntiva. Los efectos sobre estas estructuras se pueden detectar fácilmente mediante la observación conjunta. Los eventos asociados con el daño ocular se clasifican teniendo en cuenta los criterios de irritación y corrosión (Bruner, 1992):

- La **irritación ocular** es un cambio inflamatorio reversible que ocurre en la superficie anterior del ojo, tras la exposición directa a un compuesto y persiste durante 24 horas.
- La **corrosión** se considera un daño irreversible del tejido debido a la exposición a un compuesto que destruye los tejidos gruesos del ojo.

Los irritantes oculares producen simultáneamente cambios en múltiples tejidos del segmento anterior del ojo. La severidad de la lesión en cada uno se relaciona con la naturaleza del irritante y la recuperación depende del grado y de la extensión de la lesión a nivel celular (Bruner y col., 1998).

2.1.1. Ensayo de Draize ocular y críticas realizadas

En el pasado, la evaluación de la irritación ocular sólo se realizaba mediante métodos *in vivo*. El ensayo convencional para evaluar el potencial irritante y corrosivo de los compuestos químicos es el ensayo ocular en conejos, conocido como *ensayo de Draize ocular*, fue desarrollado por Draize y colaboradores y ha sido el ensayo estándar internacional para valorar la toxicidad ocular. Este ensayo permite evaluar los efectos oculares que aparecen por la aplicación de compuestos sobre el ojo del conejo, mediante la observación de las reacciones adversas que ocurren a nivel de conjuntiva, iris y córnea. De acuerdo con el sistema de Draize de evaluación de la severidad de las lesiones oculares, es posible clasificar los compuestos en una escala según su potencial efecto irritante (Draize y col., 1944).

Los resultados de este ensayo han sido utilizados durante años para clasificar diferentes compuestos y han constituido la base del procedimiento núm. 405 adoptado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Aunque Draize inicialmente utilizó 9 animales, la Ley Federal para las Sustancias Peligrosas (FSHA, en sus siglas en inglés) recomienda el uso de 6, si bien las normas de la OCDE recomiendan utilizar un solo animal si se sospecha que el producto es altamente irritante y se pueden utilizar dos más para confirmar los resultados (OCDE núm. 405).

Por razones éticas obvias, los métodos que emplean animales han sido más empleados que los que utilizan sujetos humanos voluntarios para determinar el riesgo que un compuesto determinado supone para los ojos. Aunque es posible exponer el ojo humano a formas diluidas de sustancias con propiedades químicas conocidas y que generalmente son seguras, es evidente que esto no se puede realizar con nuevas sustancias cuyas propiedades tóxicas aún no se conocen, debido al riesgo de causar lesiones severas (Curren y Harbell, 1998). La evaluación del potencial irritante ocular junto con el dolor y sufrimiento de los animales de experimentación ha sido el objetivo principal de las asociaciones defensoras de los animales. Este ensayo ha sido fuertemente criticado por la metodología empleada, la naturaleza subjetiva del ensayo, la relevancia del modelo animal utilizado y el dolor que causa a los animales (York y Sterling, 1998). Algunos científicos han criticado este método debido a su elevada variabilidad (Bruner y col., 1996) y subjetividad (Sina y col., 1995; Moldenhauer, 2003), demostradas en diversos estudios interlaboratorio (Balls y col., 1999).

Otros científicos opinan que los resultados se encuentran muy influenciados por el número de animales y la duración del periodo de observación (Goldberg, 1993). El método de exposición de la sustancia a ensayar así como el volumen de aplicación (Freeberg y col., 1986; Daston y Freeberg, 1991) también han sido cuestionados, debido a que no simulan lo que ocurre en el ojo humano en el caso de exposiciones accidentales a cualquier agente externo (Weil, 1985). Otros han tomado como argumento fundamental las diferencias estructurales y fisiológicas que existen entre el ojo del hombre y del conejo. El ojo de este último tiene una membrana nictitante o tercer párpado que puede eliminar o atrapar la sustancia irritante, la cual cosa podría interferir en los resultados; además, su mecanismo lagrimal es menos efectivo y existen diferencias en cuanto al grado y al tiempo de permanencia de la sustancia irritante en el ojo y, por último, difieren en cuanto al pH del humor acuoso y el grosor medio de la córnea (Cornier y col., 1995).

La OCDE ha propuesto una estrategia para minimizar el número de animales en el ensayo de Draize, basada en: datos previos, relación estructura/actividad, pH del producto y disponibilidad de métodos alternativos, entre otros (Figura 6):

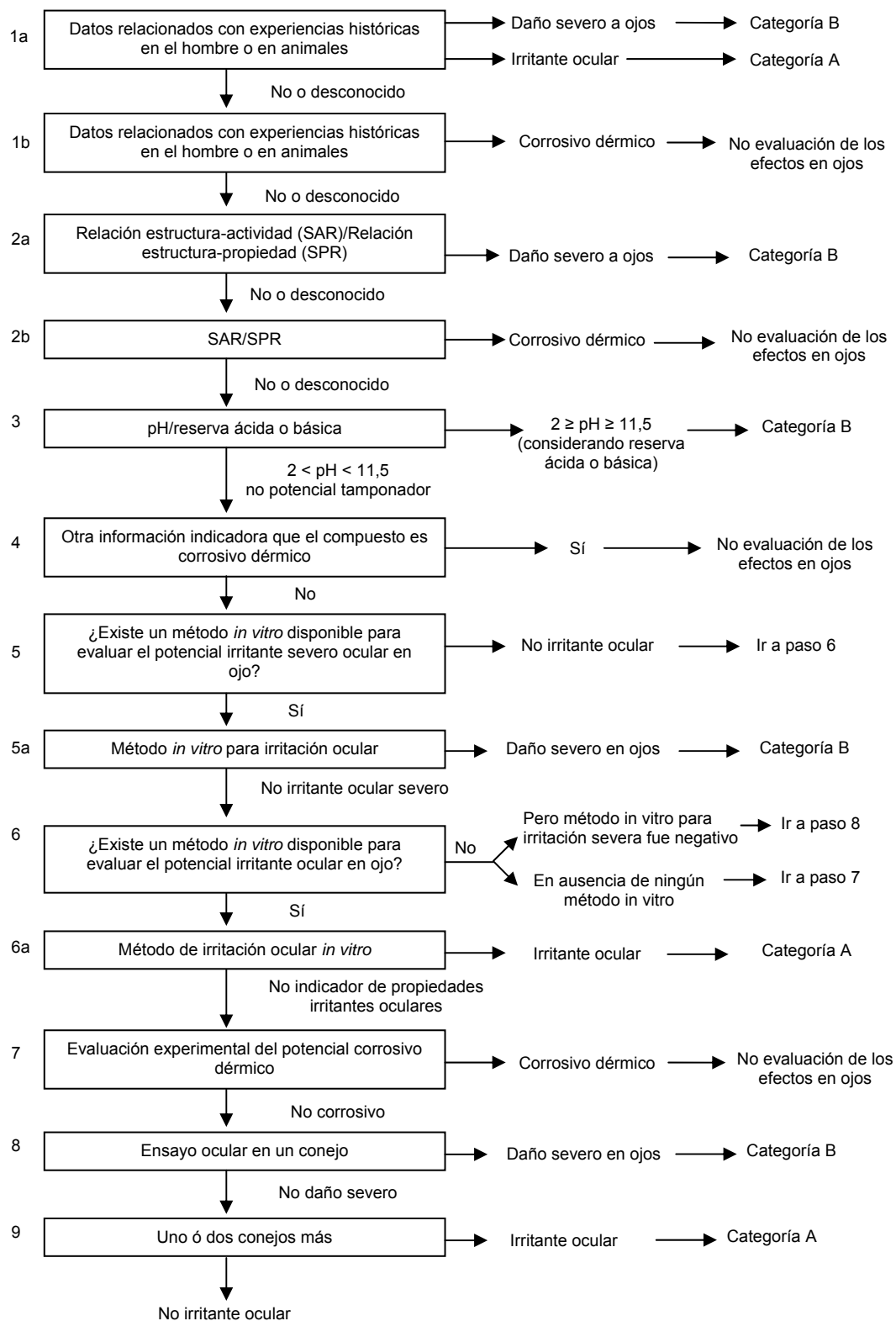


Figura 6. Estrategia propuesta por la OCDE para la evaluación de la irritación ocular (adaptado de OCDE, 1998)

2.1.2. Alternativas al ensayo de Draize ocular

Algunas organizaciones, como el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, en sus siglas en inglés), asociaciones comerciales de la industria y empresas particulares se han involucrado en la búsqueda de alternativas *in vitro* al ensayo de Draize, pero todavía no se ha validado ningún método *in vitro* que lo reemplace completamente aunque algunos ensayos se han mostrado muy prometedores para el cribado de la irritación ocular (Balls y col., 1999).

Se está realizando un esfuerzo considerable para desarrollar y validar métodos alternativos que no incluyan animales y que a su vez pueden reemplazar a los ensayos *in vivo*. Sin embargo, la necesidad de desarrollar métodos *in vitro* alternativos para valorar la irritación ocular ha supuesto el planteamiento de numerosos métodos alternativos al ensayo de Draize ocular, de los cuales destacamos los siguientes (Eskes y col., 2005):

2.1.2.1. Órganos aislados

La base de estos sistemas es la exposición *in vitro/ex vivo* de ojos aislados, córneas o cristalinos de origen bovino, porcino, de pollo o de conejo, a compuestos químicos irritantes. Estas estructuras se obtienen de mataderos o bien de animales que se han utilizado para otras pruebas toxicológicas y son mantenidos en sistemas de perfusión adecuados para evaluar los compuestos (Burton y col., 1981; Prinsen y Koëter, 1993; Gautheron y col., 1992, 1996). Se pueden determinar diferentes parámetros: opacidad corneal, permeabilidad, hidratación y grosor de los órganos aislados. Las córneas aisladas permiten realizar pruebas relativamente sencillas para un amplio abanico de sustancias sin necesidad de diluir los compuestos y además, resultan útiles para determinar qué capa de la córnea está implicada en la respuesta tóxica. Muchas veces, la posibilidad de realizar estudios histológicos a partir de las córneas tratadas permite observar la severidad de la lesión (Curren y col., 1999). Los órganos aislados permiten valorar compuestos con formas físicas y solubilidades variadas.

2.1.2.2. Modelos organotípicos: métodos en membrana corioalantoidea

La membrana corioalantoidea (CAM, en sus siglas en inglés) del huevo fertilizado de gallina se considera un modelo adecuado para imitar los efectos inducidos por las sustancias en los tejidos conjuntivales del ojo (Christian y Diener, 1996).

Una vez la CAM queda expuesta, se aplica directamente el producto y por observación directa de la misma, se determina el momento de la aparición de tres reacciones: hemorragia, lisis y coagulación. Este método, conocido como **HET-CAM**, se utiliza en la industria en fases de cribado para identificar el potencial de compuestos no

irritantes o moderadamente irritantes y en evaluaciones de seguridad de formulaciones cosméticas y materias primas y es el método aceptado por la legislación francesa para valorar la irritación ocular (Journal Officiel de la République Française, 1996). Este ensayo presenta una buena correlación con el ensayo de Draize para compuestos no irritantes y moderadamente irritantes y también para tensioactivos y formulaciones que los contienen (Spielmann, 1997; Rougier y col., 1994; Steiling y col., 1999).

Para proporcionar una técnica de evaluación objetiva a partir de los inconvenientes de falta de objetividad y cuantificación asociados al HET-CAM (Hagino y col., 1991, 1993; Itagaki y col., 1995), se diseñó un método basado en la determinación de la cantidad del colorante azul de tripán adsorbida en la CAM, conocido como **CAM-TBS**, que ha sido muy utilizado para predecir el potencial irritante ocular de diferentes tipos de sustancias (Vinardell y García, 2000).

2.1.2.3. Modelos de tejido humano reconstituido

Se han desarrollado diferentes kits comerciales como **EpiOcular™**, que es un modelo corneal formado por queratinocitos humanos normales (NHK, en sus siglas en inglés) de la epidermis cultivados en medios de cultivo sin suero y que se diferencian hasta formar una estructura multicapa muy similar al epitelio corneal (Stern y col., 1998), y el modelo **SkinEthic in vitro**, que es un epitelio corneal humano (HCE™) reconstituido formado por queratinocitos humanos procedentes de la córnea e inmortalizados (línea celular HCE) y cultivados en una interfase aire-líquido en un medio químicamente definido y el epitelio resultante, desprovisto de estrato córneo, se parece a la mucosa corneal del ojo humano (Nguyen y col., 2003).

Estos modelos se han utilizado en combinación con ensayos de citotoxicidad y de irritación, como el ensayo MTT, determinaciones de IL-1 α , PGE2, LDH y permeabilidad a la fluoresceína y expresión génica (Balls y col., 1999; Worth y Balls, 2002).

2.1.2.4. Métodos basados en citotoxicidad celular

La aplicación de ensayos de citotoxicidad para evaluar el potencial irritante ocular se basa en observar los efectos citotóxicos que algunos compuestos pueden provocar, cuando dañan el ojo, en varios tipos celulares, incluyendo los de epitelios oculares y tejidos endoteliales.

- **Ensayo de captación de rojo neutro (NRU, en sus siglas en inglés):** Es uno de los ensayos más utilizados. Se basa en la captación y acumulación del colorante vital rojo neutro en los lisosomas de las células viables, es decir, las células cuyas membranas no han sido dañadas por el compuesto a ensayar (Borenfreund y Puerner, 1985). A partir de las curvas de dosis-respuesta se puede extrapolar la concentración de la sustancia a

ensayar que es capaz de inhibir el 50 % de captación del colorante (NRU₅₀ o CI₅₀). Es un método esencial en los laboratorios cosméticos y farmacéuticos como parte de una batería de ensayos y en procesos de cribado. Las sustancias a ensayar con este método han de ser solubles y no tener pH extremos que pudieran reaccionar con los componentes del medio.

- **Ensayo de liberación de rojo neutro** (NRR, en sus siglas en inglés): Fue desarrollado para evaluar los efectos de la toxicidad inmediata como daño a la membrana plasmática y pérdida de la integridad lisosomal causada por exposiciones breves a altas dosis de compuestos, mediante la determinación de la cantidad de colorante que liberan las células que previamente lo han captado (Barstadt y col., 1991). A partir de las curvas de dosis-respuesta, se obtienen los valores de NRR₅₀ (concentración de sustancia que provoca el 50 % de liberación de colorante de las células que previamente lo han captado) como criterio toxicológico.

- **Ensayo de hemólisis** (RBC assay, en sus siglas en inglés): Constituye un buen ejemplo de los ensayos que nos permiten evaluar los daños provocados por los compuestos químicos sobre las membranas celulares. Se basa en el potencial de una sustancia química para perturbar las membranas celulares, valorando espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina de una suspensión de eritrocitos incubada con la sustancia a ensayar y bajo condiciones estándar (Muir y col., 1983; Pape y col., 1987; Pape y Hoppe, 1991; Lewis y col., 1993; Lewis, 1994). La desnaturalización (cambios en la configuración de la proteína) de la oxihemoglobina se utiliza como segundo criterio toxicológico. Además, los eritrocitos de mamífero representan un tipo celular fácilmente disponible y manejable ya que no se requieren técnicas de cultivo celular y se contribuye así a la reducción del uso de animales en la evaluación del potencial ocular.

Este ensayo es una prueba *in vitro* específica para evaluar el potencial efecto irritante agudo inducido por tensioactivos o por preparaciones que los contienen y ha sido propuesto como alternativa al ensayo de Draize ocular para evaluar este tipo de compuestos químicos (Pape y col., 1987; Pape y Hoppe, 1991; Sugai y col., 1991, 1993; Pape y col., 1999). Diferentes estudios de prevalidación han mostrado que este método presenta una sensibilidad y una especificidad superior al 80 % y una mínima discordancia respecto al ensayo de Draize ocular (Kojima y col., 1995; Ohno y col., 1994, 1999; Okamoto y col., 1999; Pape y col., 1999). El ensayo de hemólisis discrimina el daño ocasionado a la membrana y a las proteínas como criterios principales de valoración que correlacionan con las lesiones en la conjuntiva y la córnea del ojo del conejo respectivamente. Existen dos protocolos estandarizados para este ensayo: el protocolo *INVITTOX* núm. 37 y otro derivado de éste, el protocolo *INVITTOX* núm. 99.

Actualmente, este método se encuentra en estado de prevalidación (Okamoto y col., 1999; Pape y col., 1999) y diferentes grupos de investigación coordinados por ECVAM están trabajando activamente para llevar a cabo los procesos de validación definitivos.

2.1.2.5. Métodos basados en funciones celulares

- **Ensayo de liberación de la fluoresceína (FL, en sus siglas en inglés):** Se basa en la función que tiene el epitelio corneal de actuar como barrera impermeable hacia sustancias químicas potencialmente dañinas y en la aparición de irritación ocular si la estructura está dañada. El epitelio corneal se puede imitar *in vitro* mediante células epiteliales que crecen adheridas en cultivo ya que forman desmosomas entre ellas. Las células crecen en unos soportes de manera que al llegar a la confluencia, el medio de cultivo queda separado en dos compartimentos. Las células se exponen a la sustancia en el compartimento superior y a continuación se incuban con una solución de fluoresceína (Tchao, 1988; Clothier, 1993). La cantidad de fluoresceína que pasa al compartimento inferior se mide espectrofotométricamente y es un indicador del grado de perturbación de la barrera celular. Se utiliza en laboratorios cosméticos como parte de una batería de ensayos (Kruszewski y col., 1995).

2.1.2.6. Relaciones estructura-actividad para irritación ocular

La irritación ocular es un proceso difícil para realizar un modelo *in silico*, debido a la complejidad de las respuestas implicadas en el proceso. Se han realizado algunas aproximaciones a partir de efectos físicos, como la penetración ocular y la corrosión (Cronin y col., 2003). Sin embargo, los planteamientos más utilizados se han centrado en el desarrollo de: a) modelos cuantitativos tradicionales, en los que se predice una medida del potencial irritante ocular; b) modelos de clasificación, en los que se predice una clasificación del potencial irritante ocular; c) simulación de interacciones entre moléculas y membranas; d) modelos de redes neuronales, y e) aproximaciones de sistemas especiales (Worth y Cronin, 1999, 2000).

2.1.2.7. The Low Volume Eye Test (LVET)

Es un método de refinamiento del estándar ensayo de Draize ocular desarrollado para seleccionar las condiciones óptimas requeridas para conseguir una mayor precisión a la hora de predecir los riesgos para el ojo humano (Freeberg y col., 1986; Cerven y Moreno, 1998). En este ensayo, tan sólo 0,01 ml de la sustancia a ensayar (en lugar de 0,1 ml ó 0,1 mg) se aplican directamente en la córnea del ojo del animal en el lugar de en el saco conjuntival. Además, el párpado no se mantiene cerrado para retener la muestra sino que se deja que los mecanismos naturales como el parpadeo permitan diluir o retirar la sustancia y el hecho de depositar menos cantidad de sustancia en el ojo del conejo disminuye el dolor sufrido por el animal.

2.1.2.8. Otros ensayos

- **Modelo de irritación mucosal:** Permite estimar los potenciales irritantes oculares de sustancias químicas mediante el empleo de babosas, *Arion lusitanicus*, como organismo para el ensayo (Adriaens y Remon, 2002). El efecto irritante de las sustancias se estima mediante la cantidad de moco producido durante el tratamiento y el daño a la membrana, mediante la liberación de proteínas y LDH de la superficie mucosal de la babosa tras el tratamiento. Se utiliza para evaluar la seguridad de formulaciones altamente bioadhesivas.

- **Ensayo IRRITECTION®:** Este kit se basa en el principio de que la irritación ocular y la opacidad corneal son el resultado de la perturbación o desnaturalización de las proteínas corneales (Kelly, 1989). Está compuesto por un reactivo macromolecular de glicoproteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos de bajo peso molecular que cuando se rehidrata forma una matriz macromolecular que mimetiza la estructura altamente ordenada de la córnea transparente (Gordon, 1992).

- **Ensayo de crecimiento del tubo de polen:** Se basa en la cuantificación fotométrica de la producción de la masa del tubo de polen bajo condiciones estandarizadas *in vitro* (Kappler y Kristen, 1990). El polen de plantas de tabaco se resuspende en una concentración definida en medio de cultivo y se cultiva unas 18 horas en presencia de varias concentraciones de la sustancia a ensayar.

2.2. Irritación dérmica

La **piel** está constantemente expuesta tanto de manera intencionada como accidental a numerosos compuestos químicos, incluidos los cosméticos y productos de limpieza, por lo que es necesario valorar el potencial irritante de un producto o ingrediente concreto que pueda causar irritación dérmica como parte del proceso de evaluación de la seguridad.

La piel es un tejido muy complejo y heterogéneo tanto en términos histológicos como celulares. Es el principal tejido diana para diversos agentes externos y también nos protege de los peligros del medio ambiente, la radiación ultravioleta y la pérdida de agua endógena. Está compuesta por tres capas: **epidermis, dermis y tejido subcutáneo** (Wallace, 2001).

La parte más externa de la epidermis consiste en un epitelio escamoso compuesto principalmente por *queratinocitos*. Estas células llevan a cabo un proceso de diferenciación que finalmente da lugar al ensamblaje del *estrato córneo*, el cual está formado por queratinocitos ricos en queratina, llamados *corneocitos*. Estas células están

estrechamente conectadas por desmosomas y el espacio intercelular contiene una matriz compuesta por lípidos, sobre todo ceramidas y lípidos neutros como el colesterol libre, ésteres de colesterol y ácidos grasos libres (Schürer y Elias, 1991). Esta composición representa una barrera efectiva contra influencias exógenas y la pérdida de agua endógena. Algunos experimentos han mostrado que la concentración de sustancia irritante unida a la dependencia del tiempo de exposición está fuertemente relacionada con la capacidad de barrera del estrato córneo (Ponec y Kempenaar, 1995). Muchos irritantes pueden alcanzar el estrato córneo y dar lugar a la pérdida de lípidos y a la desnaturalización de proteínas.

Los fibroblastos, las células endoteliales e inmunitarias (células de Langerhans) residentes en la dermis y los queratinocitos intervienen en las reacciones de vigilancia inmunitaria que tienen lugar en la epidermis, por lo que desempeñan un papel crucial en el inicio, modulación y regulación de la inflamación (Coquette y col., 1999, 2000) y tras ser estimulados por agentes exógenos desencadenan diversas respuestas inflamatorias (Steinhoff y col., 2001). En la respuesta inmunitaria de la piel, los *macrófagos*, una forma de fagocitos, son los primeros en reaccionar ante los intrusos. Aparecen en la piel con diversas formas: en la epidermis como células de Langerhans y en la dermis como macrófagos de tejido. Las *células de Langerhans* juegan un papel esencial en el sistema inmunitario de la piel y su función se encuentra estrechamente relacionada con el sistema de defensa que actúa en todo el cuerpo. Estas células se encuentran en las capas epidérmicas inferiores y están especializadas en activar las células T con el fin de provocar una respuesta inmunitaria primaria.

Podemos definir la **irritación dérmica** como una reacción inflamatoria no inmunogénica local que aparece en un periodo de tiempo breve después de la estimulación y que a menudo desaparece en pocos días (Harvell y col., 1995). A simple vista, la uniformidad de las respuestas observadas no permite diferenciar entre irritación dérmica y dermatitis alérgica por contacto (Frosch, 1995). En contraste con las reacciones alérgicas, la irritación dérmica se inicia a través de un efecto inflamatorio directo en la piel, excluyendo así los mecanismos de causalidad involucrados en la sensibilización (Basketter, 1999). En general, la irritación de la piel inducida por productos químicos se puede dividir en tres subtipos básicos (Corsini y Galli, 2000):

- La irritación dérmica **aguda**: Tiene lugar de manera rápida después de una única exposición a un compuesto muy irritante.
- La irritación dérmica **acumulativa**: Es la más común y se presenta tras exposiciones repetitivas a irritantes leves.
- La irritación dérmica **crónica**: Se caracteriza principalmente por hiperproliferación e hiperqueratosis que finalmente se convierte en un endurecimiento de la epidermis.

En contacto con la piel, una parte de la sustancia química o de la formulación penetra a través de las capas que forman el estrato córneo y entra en contacto con las capas de la epidermis y la dermis, donde el compuesto causa daños celulares que van desde perturbaciones sutiles en la membrana o cambios bioquímicos hasta muerte celular. Como respuesta, las células liberan mediadores inflamatorios y citocinas para iniciar la respuesta inflamatoria, que constituye una señal amplificada de la citotoxicidad inicial. Las marcas visuales de la inflamación son el eritema y el edema, debido al incremento local de flujo sanguíneo y plasma procedente de los vasos sanguíneos. Dada la complejidad de los mecanismos implicados en las respuestas a sustancias irritantes (Figura 7), es necesario desarrollar modelos *in vitro* para predecir la irritación dérmica.

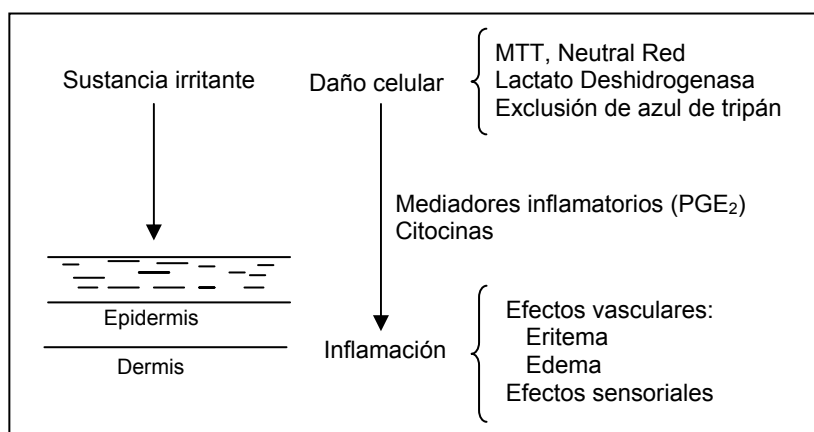


Figura 7. Esquema simplificado de los mecanismos de la irritación dérmica (adaptado de Osborne y Perkins, 1994)

También es importante invertir esfuerzos para conocer los mecanismos implicados en la irritación dérmica y las respuestas moleculares y celulares posteriores al contacto con agentes irritantes ya que aún no se conocen del todo. Según las diferentes clases y estructuras químicas de sustancias con potencial irritante, parece muy probable que puedan estar implicadas diferentes vías en la irritación dérmica.

El mecanismo por el cual los tensioactivos causan irritación dérmica tampoco es del todo conocido pero los factores que contribuyen al potencial efecto irritante incluyen (Benassi y col., 2003):

1. Acción directa en los componentes del estrato córneo (lípidos y proteínas).
2. Interacción con las células epidérmicas y alteración de su capacidad proliferativa.
3. Acción en los componentes dérmicos e inducción de la liberación de mediadores proinflamatorios (citocinas) e inflamación.

Estas vías de acción, tanto combinados como por separado, provocan irritación. Pero, independientemente del tipo de compuestos químicos y de su mecanismo de acción, el inicio de la irritación dérmica inducida por estos compuestos sigue los principios

generales de la Toxicología. Sus efectos biológicos dependen de varios factores: concentración, duración y frecuencia de la exposición, región de piel expuesta, tasa de penetración y potencial tóxico propio de cada sustancia.

2.2.1. Ensayo de Draize dérmico y críticas realizadas

Para evaluar la seguridad de nuevos compuestos químicos, todavía se valora su potencial efecto irritante mediante la aplicación en animales mediante el *ensayo de Draize dérmico* (Draize y col., 1944). Después de rasurar la piel del animal, se aplica el producto en una zona delimitada de la piel y se deja en contacto un tiempo determinado con la ayuda de un vendaje oclusivo. Transcurrido ese tiempo se anota la aparición o no de cambios visibles en la piel como eritema y edema (OCDE, núm. 404). Se han realizado varias modificaciones de este ensayo, como exposiciones de 1 a 4 horas en lugar de 24 horas, el uso de 3 animales en lugar de 6 y diferentes tipos de parches. Sin embargo, los conceptos básicos del protocolo de Draize, como el empleo de conejos albinos y clasificaciones dérmicas cuantitativas derivadas de valoraciones subjetivas de eritema y edema, se han incorporado a los requisitos para las agencias reguladoras internacionales (ECETOC, 1990).

La determinación de la irritación dérmica en animales les causa dolor y malestar y los resultados obtenidos no siempre permiten predecir el efecto en humanos, debido en parte a las diferencias existentes entre la anatomía de la piel humana y la del conejo (Nixon y col., 1975; York y col., 1998). Además, la valoración de los compuestos mediante el ensayo de Draize presenta baja reproducibilidad debido a la subjetividad del evaluador. Con el objetivo de reemplazar las pruebas realizadas en animales y mejorar la predicción del potencial irritante de los compuestos, la industria cosmética y de higiene personal, en Europa representadas por la Asociación Europea de Perfumería, Higiene y Cosmética (COLIPA, en sus siglas en inglés), desarrolla y utiliza varios sistemas de métodos alternativos. Sin embargo, hasta la fecha no existe ningún protocolo validado para evaluar la irritación dérmica *in vitro* de productos cosméticos o compuestos químicos (Zuang y col., 2005; Garthoff, 2005), en parte debido al uso de varios protocolos experimentales que difieren en la concentración que se aplica de producto, el tiempo de exposición y el de incubación tras el tratamiento.

2.2.2. Alternativas al ensayo de Draize dérmico

Existen diferentes modelos y marcadores para evaluar el potencial efecto irritante dérmico aunque la mayoría de sistemas *in vitro* han sido desarrollados principalmente para evaluar la irritación aguda. Como consecuencia de la ausencia de síntomas visibles *in vitro*, es inevitable estudiar biomarcadores para evaluar la irritación. El término *biomarcador* hace referencia a: cambios en la viabilidad o citotoxicidad, cambios

morfológicos, expresión diferencial de genes y distribución diferencial de las proteínas u otras moléculas después del tratamiento con los compuestos irritantes.

Los métodos alternativos *in vitro* para la evaluación de la irritación dérmica incluyen desde células aisladas de piel (queratinocitos y fibroblastos) hasta modelos tridimensionales equivalentes de piel y permiten realizar experimentos a nivel molecular, celular y tisular (Figura 8). Además, los cultivos comerciales son especialmente interesantes como métodos alternativos ya que son una fuente potencial de suministro de cultivos estandarizados que se pueden utilizar en algunos laboratorios.

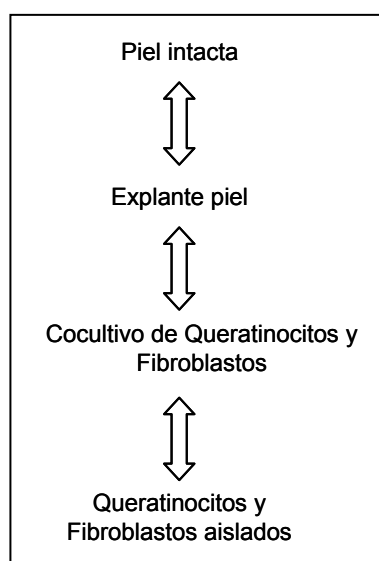


Figura 8. Integración de diferentes tipos de cultivos de piel para el desarrollo de métodos *in vitro* para irritación dérmica (adaptado de Osborne y Perkins, 1994)

Algunos de los métodos alternativos para evaluar la irritación dérmica se detallan a continuación (Zuang y col., 2005):

2.2.2.1. Modelos celulares

La mayoría de métodos alternativos *in vitro* se basan en el empleo de cultivos de células de mamífero y en la aplicación de ensayos de citotoxicidad, ya que son sencillos y reproducibles y permiten obtener criterios de valoración definidos. Una de las mayores ventajas de los sistemas de cultivos celulares es la posibilidad de obtener células de un órgano diana determinado e incluso, en algunos casos, de origen humano.

Las muestras necesarias para los cultivos primarios son limitadas y variables y además la posibilidad de observar cambios en la respuesta tóxica aumenta con el número de pasajes. La ventaja principal de las líneas celulares respecto a los cultivos primarios es que evitan las diferencias en los resultados debidas a la variación de los donantes y proporcionan resultados reproducibles (van de Sandt y col., 1999; Lee y col., 2000).

Los cultivos celulares funcionan mejor con sustancias solubles en medio acuoso aunque en algunos casos esto se puede solucionar disolviendo el compuesto en DMSO o etanol, siempre y cuando se tenga en consideración este efecto en los resultados. También presentan otros inconvenientes como ausencia de estrato córneo y falta de interacción entre diferentes tipos celulares. No obstante, la mayor ventaja para la evaluación de la toxicidad *in vitro* en estas células es su fácil manejo ya que a menudo no presentan requisitos especiales de cultivo, la accesibilidad a modificaciones genéticas estables y su utilidad en procesos de cribado. Las líneas celulares modificadas genéticamente son más sensibles hacia un amplio rango de sustancias y permiten crear sistemas sensibles y de fácil lectura, que mejoran la tecnología de la toxicología *in vitro* (Lawrence y col., 1996; van de Sandt y col., 1999; Roguet, 1999).

Dado que los queratinocitos juegan un papel muy importante en el inicio, modulación y regulación de la irritación dérmica, son las células más utilizadas para valorarla. Además de líneas celulares de queratinocitos también es útil utilizar otros tipos celulares como fibroblastos y otras células que se infiltran en los procesos inflamatorios, ya que también desempeñan una función importante en el proceso de irritación (Moreno, 2000; Coquette y col., 1999, 2000). Las líneas de fibroblastos más utilizadas en ensayos de irritación son los fibroblastos de ratón 3T6 y 3T3 (Korting y col., 1994a; Moreno, 2000; Benavides y col., 2004a, 2004b).

Las **líneas celulares** establecidas que crecen permanentemente se utilizan habitualmente como modelos *in vitro*. Sin embargo, algunas líneas celulares inmortalizadas, aunque no son tumorigénicas en animales, pueden presentar poblaciones aneuploides, genéticamente inestables y heterogéneas de la misma manera que las células humanas inmortalizadas.

Entre las líneas celulares transformadas cabe distinguir las transformadas con virus y las inmortalizadas espontáneamente (Baden y col., 1987; Boukamp y col., 1988; Rice y col., 1993). Estas líneas celulares no son portadoras de oncogenes virales, que podrían provocar inestabilidad genómica, y por eso representan mejor *in vitro* la epidermis normal.

Las células de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente de la línea celular HaCaT (Boukamp y col., 1988) se parecen mucho a los queratinocitos normales en su crecimiento y en sus características de diferenciación, tanto en cultivo como en trasplantes superficiales en ratones "nude" (sin pelo y sin timo) (Breitkreutz y col., 1991, 1998). Su capacidad de diferenciación total y su balance genético hacen que esta línea celular sea el paradigma más utilizado de NHK. En condiciones normales de cultivo, estas células han mostrado valores de toxicidad muy similares a los obtenidos en NHK. Este hecho indica que pueden ser buenas candidatas para evaluar toxicidad e irritación dérmica bajo condiciones de cultivo convencionales.

En los cultivos celulares, los primeros pasos implicados en la inflamación se pueden valorar mediante viabilidad celular y determinación de la liberación de mediadores inflamatorios o citocinas, que han sido desarrollados para evaluar la toxicidad intrínseca de un compuesto químico. La citotoxicidad se puede evaluar de diferentes formas (Anderson y Russell, 1995), basándose en:

- Cambios en la morfología celular (observación microscópica para evaluar el tamaño y la forma, contactos célula-célula, número, tamaño y forma del núcleo, inclusiones intracelulares).
- Viabilidad celular (captación de rojo neutro, exclusión de azul de tripán, número de células).
- Metabolismo celular (concentración de ATP, reducción de la sal de tetrazolio o MTT).
- Integridad de la membrana celular (pérdida de enzimas e iones).
- Proliferación celular (incremento del número de células, del número de colonias por área o del contenido total de DNA, RNA y proteína).
- Adhesión celular (adherencia a la superficie del cultivo, desprendimiento de la superficie del cultivo, adhesión célula-célula).
- Captación o incorporación de precursores radioactivos (síntesis de aminoácidos y proteínas, timidina y síntesis de DNA, uridina y síntesis de RNA).

Es importante destacar dos aspectos de los estudios basados en citotoxicidad:

1. Los ensayos en cultivos celulares sin un estrato córneo que haga de barrera pueden proporcionar una predicción limitada, es decir, a menudo, se obtiene una sobrepredicción ya que no todos los compuestos son capaces de atravesar el estrato córneo (van de Sandt y col., 1999). Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad resultan muy útiles en los procesos de cribado de sustancias y para discriminar entre sustancias irritantes y no irritantes (Dickson y col., 1993, 1994; Lawrence, 1996; Lawrence y col., 1997; Lee y col., 2000; Martínez y col., 2006).
2. Presentan una buena correlación entre el potencial irritante y la reducción de la viabilidad pero hay otros factores implicados en el proceso de irritación que hacen que la citotoxicidad general no sea un modelo predictivo adecuado por si solo (Fentem y col., 2001) y por eso es necesario acompañar los ensayos de citotoxicidad de otros métodos.

La IL-1 α es un mediador inflamatorio muy importante en la piel y se cree que es el iniciador principal de la inflamación (Coquette y col., 2000). Esta citocina se expresa de manera constitutiva en queratinocitos y se acumula en el citoplasma o queda unida a la membrana de los queratinocitos de todas las capas de la epidermis (Dinarello, 1998).

La epidermis es un amplio reservorio de IL-1 α , que se elimina mediante descamación, debido a que esta citocina no tiene una secuencia líder hidrofóbica para la secreción transmembrana. Por lo tanto, la IL-1 α es únicamente liberada por los poros de los queratinocitos dañados tras una lesión o perturbación de la membrana (Dinarello, 1998), lo que constituye un acontecimiento primario en la defensa de la piel. Además, esta citocina induce la expresión de ella misma y de otras citocinas proinflamatorias como la IL-6 y IL-8 mediante unión al receptor de IL-1, que se expresa en la superficie de la membrana celular de los queratinocitos (Sims y col., 1993). A nivel molecular, IL-1 es también un potente regulador de la vía NF κ B. La transcripción del factor NF κ B controla la expresión de varios genes asociados con la regulación de la homeostasis epidérmica y las respuestas inflamatorias (Stylianou y col., 1992).

2.2.2.2. Modelos de piel humana reconstituida

Entre los modelos más utilizados para determinar el potencial irritante dérmico de sustancias químicas o preparados cosméticos *in vitro* se encuentran el uso de equivalentes de piel formados por tipos celulares presentes en la piel: queratinocitos, fibroblastos, corneocitos y melanocitos. Las razones para favorecer los equivalentes de piel en lugar de los cultivos en monocapa de queratinocitos es que permiten valorar compuestos con baja solubilidad o formulaciones acabadas y a menudo, las concentraciones que inducen irritación en cultivos en monocapa de queratinocitos en cultivo están varios órdenes de magnitud por debajo. Por tanto, los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con cultivos celulares son, a veces, difíciles de interpretar o de correlacionar con la situación *in vivo*.

Estos modelos tridimensionales se generan por crecimiento de cultivos de queratinocitos sobre varios sustratos en una interfase aire-líquido y permiten la aplicación tópica de sustancias diluidas o sin diluir (Botham y col., 1998; Fentem y col., 2001; Faller y col., 2002). Los equivalentes de piel humana reconstituida son bastante parecidos a la piel humana aunque difieren de ésta en algunos aspectos, como la tasa de penetración de las sustancias aunque la diferencia más importante es la composición celular: endotelio de los vasos sanguíneos, células inflamatorias, nervios, etc., que no están en los modelos de equivalentes de piel y son esenciales para evaluar los síntomas visibles *in vivo* en el proceso de irritación. Por tanto, el uso de equivalentes de piel limitado a queratinocitos y fibroblastos obliga a los científicos a examinar otros parámetros más sofisticados. Entre los modelos más utilizados destacamos los siguientes:

- **Modelo EPISKIN:** Este modelo tridimensional consiste en una matriz de colágeno que representa la dermis, encima de la cual se extiende una epidermis diferenciada y estratificada (Tinois y col., 1991). La sustancia a ensayar se aplica en la superficie del sistema y a continuación los efectos se determinan mediante el ensayo MTT. El

porcentaje de viabilidad celular permite distinguir entre irritantes y no irritantes (Roguet y col., 1994, 1998) pero también se pueden determinar otros marcadores más mecánicos (Faller y col., 2002; Roguet y col., 1998) como la IL-1 α o la proteína LDH.

- **Modelo EpiDerm:** Consiste en queratinocitos derivados de piel humana que crecen en soportes *Millicell* específicos hasta formar un sistema *in vitro* multicapa y diferenciado que imita la epidermis humana (Cannon y col., 1994; Earl y col., 1999). El protocolo original se basa en determinar el tiempo de exposición a la sustancia a ensayar necesario para disminuir la viabilidad celular en un 50 % (TE₅₀) en comparación con un estándar de referencia.

- **Modelo Skin Ethic:** Se obtiene mediante el cultivo de queratinocitos humanos normales sobre un soporte de policarbonato en una interfase aire-líquido y como resultado se forma un estrato córneo (Rosdy y Clauss, 1990). Los criterios de valoración más utilizados son: viabilidad celular, liberación de IL-1 α y cambios morfológicos.

2.2.2.3. Explantes de piel y cultivo de órganos

- **Ensayo de función de integridad en piel de ratón (SIFT, en sus siglas en inglés):** Se basa en la evaluación de la integridad de la piel de ratón tras la exposición a una sustancia (Heylings y col., 2001). Se utilizan dos métodos para valorar la integridad del estrato córneo: la pérdida de agua transepidérmica (TEWL, en sus siglas en inglés) y la resistencia eléctrica.

- **Modelo Prediskin:** Los cultivos de piel humana se exponen a las sustancias a ensayar durante 20 horas y a continuación se valoran los efectos en el porcentaje de viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Fentem y col., 2001).

- **Ensayo en oreja de cerdo:** Se basa en la determinación del incremento absoluto de TEWL de la superficie de la piel tras la exposición de la oreja de cerdo a la sustancia a ensayar y permite distinguir entre irritantes y no irritantes.

2.2.2.4. Relaciones estructura-actividad para irritación dérmica

Los modelos QSAR no permiten un reemplazo por sí mismos pero constituyen una herramienta valiosa para procesos de cribado y priorización. Se han realizado relativamente pocas relaciones estructura-actividad para irritación dérmica: a) QSAR para predecir el índice de irritación primario (PII, en sus siglas en inglés) de compuestos orgánicos (Barratt, 1996), y b) métodos para predecir el PII del peso molar de fenoles (Hayashi y col., 1999).

2.3. Fototoxicidad

La fototoxicidad o fotoirritación es una reacción aguda no inmunológica de la piel e inducida por la luz visible o la ultravioleta como consecuencia del contacto con una sustancia o compuesto fotoactivo. El término aguda hace referencia tanto a reacciones inmediatas como retardadas (por ejemplo, a las 48 horas). Este tipo de irritación se debe a los cambios moleculares que experimenta la estructura de un compuesto químico e inducidos por la luz cuando se aplican sobre la piel (Emmett, 1986). Se puede comparar con la irritación primaria, ya que los compuestos fototóxicos provocan una respuesta similar tras la primera exposición si hay suficiente energía lumínica de una apropiada longitud de onda y una cantidad suficiente de producto.

La evaluación de la fototoxicidad de nuevos compuestos es esencial para valorar los posibles daños o lesiones que puede sufrir la piel tras la exposición solar. Regularmente, la evaluación de la fototoxicidad se ha realizado *in vivo* en conejos tras la aplicación tópica de la sustancia a ensayar y la exposición a la luz UV pero también se han utilizado ratones, ratas y cobayas (Spielmann y col., 1994a).

En Europa, desde el año 2000, no está permitido evaluar el potencial fototóxico agudo en animales ya que se ha aceptado un método alternativo con propósitos reguladores. Teniendo en cuenta las evidencias científicas derivadas de los estudios de validación y de los resultados de laboratorios de la industria, se ha establecido un consenso por el cual la evaluación del potencial fototóxico agudo ha de realizarse mediante métodos *in vitro*. Debido a su elevada especificidad y sensibilidad, el ensayo validado de fototoxicidad mediante captación de rojo neutro en fibroblastos 3T3 (3T3-NRU-PT, en sus siglas en inglés) es el ensayo esencial de fototoxicidad que se requiere según la legislación vigente. Sin embargo, existen dos métodos *in vitro* adicionales que han revelado resultados prometedores: RBC-PT (ensayo de fototoxicidad en eritrocitos o fotohemólisis) y H3D-PT (ensayo de fototoxicidad en un modelo tridimensional de piel humana) y que se pueden utilizar cuando no sea posible obtener suficiente información sobre el potencial fototóxico de un compuesto químico con el ensayo 3T3-NRU-PT. Una ventaja del ensayo de fotohemólisis es que permite utilizar altas dosis de UVB en el espectro de irradiación y proporciona información del mecanismo de fototoxicidad. En el ensayo H3D-PT, se utilizan células primarias de piel humana metabólicamente competentes en una estructura organotípica reconstruida que incluye una barrera de estrato córneo y por tanto, permite evaluar la biodisponibilidad de un compuesto químico. Aunque todavía no ha sido validado para ese propósito, el ensayo H3D-PT se utiliza actualmente en la industria cosmética para evaluar la relevancia de los resultados positivos obtenidos en el 3T3-NRU-PT con respecto a la biodisponibilidad en piel humana (Spielmann y col., 2000).

2.3.1. Ensayo de fototoxicidad mediante captación de rojo neutro en fibroblastos 3T3 (3T3-NRU-PT)

Este ensayo ha sido establecido a escala mundial como estándar para evaluar el potencial fototóxico de compuestos químicos en laboratorios de cosmética, química e industrias farmacéuticas (OECD núm. 432; EC, 2000; SCCNFP, 2003). Teniendo en cuenta lo establecido por la Directiva 86/609/ECC sobre la protección de animales utilizados en experimentación u otros propósitos científicos (EEC, 1986) y en la legislación vigente, la evaluación del potencial fototóxico de las sustancias químicas y productos cosméticos en animales no está permitida en los Estados Miembros de la Unión Europea.

El ensayo de citotoxicidad NRU con fibroblastos Balb/c 3T3 (Borenfreund y Puerner, 1985) ha sido adaptado para evaluar la fototoxicidad. Las células 3T3 se incuban con varias concentraciones de un compuesto químico en placas de 96 pocillos durante 1 hora. A continuación, las células se exponen durante 50 minutos a luz UV/visible (con una radiación UVA efectiva de $1,67 \text{ mV/cm}^2$) y se determina la captación de rojo neutro (NRU, en sus siglas en inglés) 24 horas después midiendo la densidad óptica a 540 nm (Spielmann y col., 1994a). Al mismo tiempo, una segunda batería de placas con los mismos compuestos químicos se mantiene en oscuridad y se evalúa en paralelo. Se calcula la concentración de producto que causa el 50 % de inhibición de la viabilidad celular (CI_{50}) a partir de las curvas concentración-respuesta y se compara la citotoxicidad del compuesto en "oscuridad" (sin luz UV) ($CI_{50} \text{-UV}$) con la del compuesto químico expuesto a una dosis no citotóxica de luz UV o luz visible ($CI_{50} \text{+UV}$). La fotocitotoxicidad se expresa como reducción de la captación del colorante vital rojo neutro 24 horas después de la exposición de los fibroblastos al compuesto a ensayar en presencia de luz UV (células irradiadas) en comparación con células que han sido expuestas al mismo compuesto pero en ausencia de luz UV (células no irradiadas).

Para distinguir entre compuestos fotoirritantes y no fotoirritantes, se utiliza el factor de fotoirritación (PIF, en sus siglas en inglés), que se define como la proporción de valores de CI_{50} determinados en ausencia y en presencia de luz UVA (Spielmann y col., 1994a, 1994b): $PIF = (CI_{50} \text{-UV}) / (CI_{50} \text{+UV})$. A partir de los resultados de validación de este ensayo, se ha aceptado un modelo de predicción, mediante el cual una sustancia con un $PIF < 2$ indica no fototoxicidad; $2 < PIF < 5$, probable fototoxicidad, y $PIF > 5$, fototoxicidad (OCDE núm. 432).

2.3.2. Ensayo de fotohemólisis (RBC-PT)

Permite valorar el potencial fototóxico que presentan algunos compuestos químicos por su capacidad de perturbar la membrana del eritrocito, oxidar la hemoglobina o ambas bajo la exposición a la luz UV. La producción de radicales libres y la oxidación de la

hemoglobina son criterios de valoración importantes a tener en cuenta en la fototoxicidad en eritrocitos. La formación de methemoglobina se observa a menudo en la evaluación de la fototoxicidad en los eritrocitos, por lo que tanto la fotohemólisis como la oxidación de la hemoglobina se pueden valorar en este ensayo combinado de fotoirritación (Pape y col., 1994, 2001).

Este método posee numerosas ventajas: resulta útil y económico, permite realizar cribados de manera rápida de los compuestos a ensayar y presenta una buena correlación total respecto los datos obtenidos *in vivo* en individuos voluntarios (Spielmann y col., 1994b). Otra ventaja adicional para usar eritrocitos, además de su fácil manipulación y disponibilidad, es su resistencia a la luz UVB de corta longitud de onda, lo que permite una exposición prolongada a todo el espectro solar (Spielmann y col., 2000).

Por tanto, se puede considerar como método *in vitro* útil para obtener información sobre los mecanismos de toxicidad, especialmente sobre efectos fotodinámicos en las proteínas de la célula y en las membranas biológicas debido a su precisión, sensibilidad y predecibilidad (Pape y col., 2001).

Todas estas características permiten realizar cribados para fotosensibilizantes y estudios sobre los mecanismos fototóxicos implicados a nivel celular. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los compuestos que sólo reaccionan con el DNA darán resultados negativos en este ensayo si la producción de especies reactivas de oxígeno no forma parte de los mecanismos de citotoxicidad (reacciones fotodinámicas).

Este ensayo ha sido sometido a estudios de prevalidación y validación fase II aunque, por el momento, no se están llevando a cabo actividades de validación definitivas si bien los laboratorios que utilizan este método pueden proporcionar información sobre las mejoras realizadas en el protocolo INVITTOX núm. 81 (Pape y Pfannenbecker, 1994).

2.4. Ecotoxicidad acuática

La Ecotoxicología es la rama de la Toxicología, incluida en la Ecología que se encarga de estudiar las consecuencias ecológicas de la contaminación de los medios naturales de un ecosistema provocadas por contaminantes naturales o sintéticos. Es la ciencia que estudia los efectos tóxicos de sustancias químicas y agentes físicos sobre los organismos vivos, especialmente sobre poblaciones y comunidades dentro de ecosistemas definidos. También incluye el estudio de los caminos de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente (Truhaut, 1977; Butler y col., 1978).

La evaluación del impacto de una sustancia química para la salud humana es muy importante pero la comprensión de su impacto en ecosistemas enteros así como de sus

partes resulta primordial y por eso, el objetivo de la toxicología ambiental es tan amplio y variado.

La toxicología acuática difiere de la toxicología en mamíferos en varios aspectos. El objetivo principal de la toxicología acuática es evaluar el efecto de los tóxicos en diversas poblaciones y comunidades de plantas y animales que habitan en los medios de agua dulce y salada (Tanaka, 2003). Debido a que los productos químicos pueden aparecer en el medio natural cuando son eliminados, es necesaria la evaluación del potencial efecto tóxico sobre el medio ambiente (Jager y col., 2006).

El medio ambiente marino y de agua dulce está formado por complejos ecosistemas como mares, ríos, lagos, pantanos y estuarios. Cada uno de estos ecosistemas contiene biota única representada por miles de especies que a menudo están expuestas a gran variedad de tóxicos procedentes en muchos casos de procesos derivados de la actividad humana. Como consecuencia, puede producirse toxicidad y daños en el medio ambiente (Zakrzewski, 2002).

La contaminación es una consecuencia indeseable de los procesos industriales que afecta no sólo a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreversibles, tales como pérdidas de biodiversidad. Uno de los ambientes donde los factores ambientales adversos inciden de manera más directa es el acuático.

Se han utilizado numerosas especies de vida acuática para realizar los experimentos de toxicidad durante los últimos 130 años y las pruebas de toxicidad se han llevado a cabo cada vez con más frecuencia desde los años 60 debido a las numerosas regulaciones medioambientales que se han promulgado y que requieren su uso. Un ejemplo de ello son los requisitos en ecotoxicología que establece la directiva 79/831/EC (EEC, 1979) mediante la cual la comunidad europea establece que para los nuevos compuestos químicos, los ensayos de toxicidad aguda deben realizarse mediante peces y *Daphnia*. Otra razón para ello es el incremento de la disponibilidad de métodos estandarizados, como se detalla en la Tabla 3. Normalmente, las pruebas de toxicidad se llevan a cabo para cumplir con directrices reguladoras para el uso y los vertidos de compuestos químicos como pesticidas o no pesticidas (Altenburger y col., 1996).

Otra consideración a tener en cuenta es que los organismos empleados para los ensayos de toxicidad acuática deben presentar alta sensibilidad a los tóxicos, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos se espera extrapolar los resultados para proteger a todo el ecosistema, pero hay que tener en cuenta que las distintas especies presentan diferente sensibilidad frente a un amplio abanico de sustancias químicas.

Tabla 3. Ejemplos de la disponibilidad de métodos estandarizados para evaluar la toxicidad acuática (adaptado de Wallace, 2001)

APHA ^a	ASTM ^b	USEPA ^c	USEPA TSCA ^d	USEPA FIFRA ^e	OECD ^f
Ensayos de toxicidad: <ul style="list-style-type: none"> • Protozoos • <i>Daphnia</i> • Anélidos • Crustáceos • Insectos acuáticos • Peces • Algas • Plantas vasculares • Bacterias bioluminiscentes Muestreo de campo	Ensayos de toxicidad: <ul style="list-style-type: none"> • Anfibios • Invertebrados • Peces • Rotíferos • Moluscos • Microalgas Microcosmos Bioconcentración Teratogénesis Muestreo de campo	Ensayos de toxicidad en agua dulce: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ceriodaphnia dubia</i> • <i>Daphnia pulex</i> • Trucha arcoiris • <i>Selenastrum capricornutum</i> Agua salada: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mysidopsis bahia</i> • <i>Cyprinodon variegatus</i> • <i>Menidia</i> sp. • <i>Arbacia punctulata</i> • <i>Champia parvula</i> 	Ensayos de toxicidad en agua dulce: <ul style="list-style-type: none"> • Algas • Lentejas de agua • <i>Daphnia</i> • Peces (toxicidad y/o bioconcentración) Agua salada: <ul style="list-style-type: none"> • Algas • Peces (toxicidad) • Peces (bioconcentración) • Peces (primeras etapas de vida) • Ostras • Camarones 	Ensayos de toxicidad en agua dulce: <ul style="list-style-type: none"> • Invertebrados • Peces (primeras etapas de vida) • Peces (ciclo celular) • Plantas no diana • Daphnids Agua salada: <ul style="list-style-type: none"> • Moluscos • Gambas • Ostras • Peces (primeras etapas de vida) • Peces (ciclo celular) • Plantas no diana 	Ensayos de toxicidad: <ul style="list-style-type: none"> • Algas • <i>Daphnia</i> (aguda) • Peces (aguda) • Peces (prolongada) • Peces (primeras etapas de vida) Bioacumulación

^a American Public Health Association, American Public Works Association, Water Pollution Control Federation

^b American Society for Testing and Materials

^c US Environmental Protection Agency

^d US Environmental Protection Agency Toxic Substances Control Act

^e US Environmental Protection Agency Federal Insecticide, Fungicide, Rodenticide Act

^f Organization for Economic Co-operation and Development

A lo largo de la historia, se han utilizado con más frecuencia las especies animales que las de plantas y las especies de agua dulce más que las de agua salada. Pero los ensayos de letalidad aguda en peces y *Daphnia* son el eje principal de la evaluación de la seguridad medioambiental, aunque los ensayos de toxicidad aguda en peces han sido criticados por razones económicas, éticas y logísticas (Fentem y Balls, 1993; Isomaa y Lilius, 1995). Los peces, como animales desarrollados que son y con sistemas sensoriales iguales o similares a los de mamíferos, requieren la misma protección que otros vertebrados en cuanto a aspectos éticos y legales. En comparación, los ensayos de ecotoxicidad con algas y daphnias no implican el uso de especies muy desarrolladas y por tanto, no se ven afectadas por la legislación referente al cuidado de animales en los países miembros de la OCDE. También es importante que los ecotoxicólogos tengan en cuenta los últimos avances en toxicología con mamíferos en cuanto a la aplicación del principio de las 3Rs en las evaluaciones medioambientales (Sandbacka y col., 2000; Coors y col., 2004).

Hay dos tipos básicos de pruebas de toxicidad en especies acuáticas: toxicidad aguda y crónica. Las pruebas de **toxicidad acuática aguda** tienen la ventaja de ser relativamente sencillas, durar poco tiempo y ser económicas. Estos ensayos a menudo se realizan para efectuar cribados rápidos o para determinar las sensibilidades relativas de varias especies. La mortalidad de los organismos utilizados es el efecto que se monitoriza durante los ensayos a 24 y 48 horas en invertebrados o a 96 horas en peces y los organismos se exponen a condiciones estáticas y de manera puntual al rango de concentraciones a ensayar. En cambio, los ensayos de **toxicidad crónica** son mucho más complejos y requieren más tiempo para su realización y por esta razón, no se llevan a cabo con frecuencia. En las pruebas de toxicidad acuática no se pueden valorar los efectos acumulativos, crónicos y subletales de un compuesto químico pero sí se pueden determinar los cambios de conducta y las lesiones causadas por un compuesto químico (Zakrzewski, 2002).

Las pruebas de ecotoxicidad llevadas a cabo en el laboratorio con especies de agua dulce o salada se consideran relativamente precisas y fiables si nos basamos en la información de los resultados de toxicidad obtenidos de diferentes comparaciones inter e intralaboratorio. Además, realizar pruebas de ecotoxicidad en el laboratorio permite controlar las condiciones de luz y temperatura (Sandbacka y col., 2000; Wallace, 2001).

Una de las formas básicas de prevenir los problemas derivados de la contaminación es realizar un control periódico de la calidad del agua, es decir, conocer que sustancias tiene disueltas o en suspensión y a que concentración se encuentran. A menudo, las sustancias potencialmente tóxicas pueden encontrarse en concentraciones tan bajas o en condiciones ambientales tales que son indetectables con los métodos químicos convencionales.

La prevención y sobre todo la corrección de los efectos negativos de la contaminación son muy costosas. Regiones como Europa, Estados Unidos y Japón han incorporado una rigurosa legislación de control de calidad ambiental cuyos criterios surgen de los bioensayos (EEC, 1979; Altenburger, 1996). Los ensayos de toxicidad son los *bioensayos* empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Los bioensayos permiten valorar la toxicidad de una sustancia o de efluentes sometiendo a algún organismo vivo a distintas concentraciones de la sustancia a ensayar. Estos ensayos consisten en la exposición de grupos de organismos, a determinadas concentraciones del tóxico durante un tiempo determinado. Los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y mantenidos en condiciones ambientales constantes. Además, se dispone de grupos control que no se exponen al tóxico. A continuación, se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de los datos obtenidos.

La ventaja de estos métodos es que nos proporcionan información de la presencia en el agua de sustancias potencialmente tóxicas, es decir, de algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función o producir la muerte. A lo largo de los años, se han utilizado diferentes organismos en los bioensayos, desde bacterias hasta peces para realizar el control de calidad de las aguas (Wallace, 2001).

Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies frente a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico. Es útil para la investigación básica de la toxicidad, establecer criterios o patrones de calidad de las aguas superficiales o de los efluentes, la evaluación del impacto ambiental y del riesgo ecológico, y la monitorización de las condiciones acuáticas.

2.4.1. Importancia de *Daphnia magna* en Ecotoxicología

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas ampliamente en pruebas de toxicidad, por lo que existe mucha información sobre las técnicas de cultivo (Figura 9), los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos.

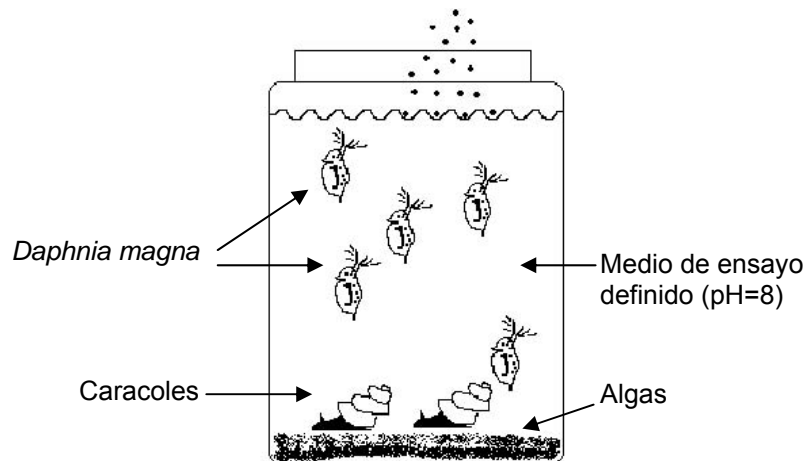


Figura 9. Esquema de un cultivo de *Daphnia magna*

Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia magna* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros. Esta especie ha sido utilizada durante muchos años como especie estándar en ensayos de ecotoxicidad, siendo los ensayos de toxicidad aguda y crónica con *Daphnia magna* los estudios más frecuentes llevados a cabo en toxicología acuática (Verge y Moreno, 2000; Guilhermino y col., 2001; Zakrzewski, 2002; Coors y col., 2004; Hodges y col., 2006).

En la actualidad, los ensayos con *Daphnia magna* son el único tipo de estudios en invertebrados de agua dulce que están formalmente aprobados por organizaciones como la CE (Comunidad Europea), la OCDE y la ISO (Organización Internacional para la Estandarización).

El hecho de que este invertebrado de agua dulce se utilice como bioindicador ambiental se debe a los siguientes factores (Mark y Solbé, 1998):

- En condiciones favorables, se reproducen por partenogénesis, un tipo de reproducción asexual que nos permite obtener muchas generaciones que son clónicas entre sí, evitando así las diferencias genéticas. Esto hace que se dé una respuesta uniforme frente a las condiciones ambientales.
- Es fácilmente cultivable en condiciones de laboratorio, ya que requiere poco espacio, y su mantenimiento es más económico que el de otros animales como los peces, los moluscos o los macrocrustáceos.
- Representan a la comunidad de zooplancton, siendo un elemento importante en las cadenas alimentarias de agua dulce. Dentro del zooplancton, el crustáceo *Daphnia magna* constituye una pieza clave en los estudios de toxicología acuática moderna, ya que como organismo filtrador es uno de los

principales consumidores de los productores primarios y lo más importante, es el alimento de invertebrados y vertebrados predadores (Hebert, 1978; Larsson y Dodson, 1993).

- Es una especie cosmopolita, por lo que la relevancia de los ensayos está reconocida y además, existe mucha información sobre su biología y ecología en múltiples estudios (Hutchinson, 1967; Gulati, 1978; Leonhard y Lawrence, 1981).
- Presenta una sensibilidad alta frente a los contaminantes cuando se compara con otras especies de invertebrados de agua dulce (Lewis y Surprenant, 1983; Baudo, 1987; Sandbacka y col., 2000; Cserhádi y col., 2002). Abe y cols. (2001) concluyeron que los invertebrados del género *Daphnia* son el mejor indicador para determinar el peligro potencial en los ambientes acuáticos continentales.