



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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de tensioactivos en la vida cotidiana es prácticamente indispensable ya que sus propiedades fisicoquímicas les hacen ser susceptibles de múltiples aplicaciones industriales y también se utilizan en diferentes campos de la tecnología y la investigación. Se han utilizado para mejorar la eficacia de los ingredientes en formulaciones farmacéuticas (Swinyard y Lowenthal, 1990; Lawrence, 1994; Kolodziejaska, 2005; Vyas y col., 2005), en cosmética (Rushton y col., 1994; Guin, 2000), en agricultura (Riechers y col., 1995; Vega y col., 2006), en biotecnología (Chang y col., 1994; Marhuenda-Egea y col., 2002) y en otros procesos industriales (Czapla y Bart, 1999; Tong y col., 2000).

Sin embargo, estos productos pueden reaccionar de manera adversa en contacto con la piel y los ojos y su potencial efecto irritante podría limitar su uso. Por tanto, el desarrollo de tensioactivos menos irritantes, menos tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente plantea vías de investigación de gran interés. En este trabajo, se ha realizado la síntesis de un grupo de tensioactivos aniónicos derivados del aminoácido lisina con diferente contraión en su estructura (dos contraiones orgánicos y voluminosos: lisina y tris, y tres inorgánicos y pequeños: sodio, litio y potasio) con el objetivo de estudiar la influencia de los contraiones en su potencial efecto irritante, así como en su modo de interacción con las membranas celulares. La síntesis de los derivados de lisina estudiados en esta Tesis se ha realizado siguiendo un procedimiento ya establecido (Vives y col., 1999), el cual tiene su base sintética en los tensioactivos no iónicos polioxietilenados del tipo N^α,N^ε-diacil lisina (Seguer, Tesis; Seguer y col., 1994). El tensioactivo 77KP se ha sintetizado por primera vez siguiendo el mismo procedimiento que para el resto.

Los tensioactivos sintetizados en este trabajo constituyen una clase de moléculas que presentan un rendimiento similar al de los tensioactivos convencionales pero tienen una estructura sencilla, análoga a la de las lecitinas naturales, que reduce su toxicidad y eleva su biodegradabilidad. Los tensioactivos derivados de aminoácidos pueden suponer una alternativa a los tensioactivos sintéticos convencionales debido a su multifuncionalidad y el uso de materias primas renovables en su proceso de síntesis (Infante y col., 1997; Pérez y col., 2002; Morán y col., 2004). Estas características les hacen candidatos para ser incluidos en diferentes preparados farmacéuticos, cosméticos o productos de cuidado personal.

Actualmente, el potencial efecto irritante ocular y dérmico de nuevos compuestos químicos todavía se evalúa mediante la aplicación del compuesto en la piel u ojos de animales de experimentación. El método utilizado es el ensayo de Draize, que permite valorar los cambios visibles observados en estas estructuras (Draize y col., 1944). También, se realizan algunos estudios *in vivo* con individuos voluntarios pero los experimentos de este tipo requieren mucho tiempo y dedicación, son bastante caros y no es posible realizarlos sin tener datos toxicológicos sólidos de los compuestos a investigar.

Desde su introducción, el ensayo de Draize ha sido fuertemente criticado tanto por razones éticas como científicas y en el transcurso de los últimos años, se han desarrollado muchos métodos *in vitro* alternativos. Estos métodos pretenden ser menos crueles y más reproducibles, además de proporcionar resultados objetivos de la predicción del potencial efecto irritante de compuestos químicos. En la actualidad, no existe ningún ensayo *in vitro* que pueda reemplazar completamente un ensayo de irritación *in vivo* ya que no es posible reproducir completamente la compleja cascada de reacciones que tienen lugar en el proceso de irritación.

Debe tenerse en cuenta que la irritación es una forma peculiar de toxicidad, ya sea accidental o por exposición aguda, donde los fenómenos que ocurren son difíciles de reproducir experimentalmente, por lo que resulta esencial seleccionar una batería de ensayos que abarquen todos los fenómenos que se producen *in vivo*. Por tanto, es necesario utilizar diferentes parámetros *in vitro* que incluyan diferentes mecanismos de acción para que la situación se parezca lo máximo posible a los procesos que tienen lugar *in vivo*. No obstante, los resultados obtenidos a menudo dependen de la adecuada selección de la batería de ensayos (Osborne y Perkins, 1994; LeClaire y de Silva, 1998; Benavides y col., 2004a, 2004b; Ubels y col., 2004; Martínez y col., 2006).

4.1. Evaluación *in vitro* del potencial efecto irritante dérmico

Los tensioactivos son muy utilizados en preparados de aplicación tópica y muchos de ellos pueden provocar reacciones irritantes en la piel, tal y como se observó después de los primeros casos de irritaciones producidas por el jabón (Blank, 1939). Por esta razón, los efectos de los tensioactivos en la piel han sido muy estudiados tanto *in vitro* como *in vivo* (Korting y col., 1994a, 1994b; Wilhelm y col., 1994; Ward y col., 1998; Barany y col., 1999; Benavides y col., 2004a, 2004b; Martínez y col., 2006) y se han utilizado como modelos en la investigación de la irritación dérmica (Lee y Maibach, 1995; Effendy y Maibach, 1995; Nicander y col., 2003). También se ha demostrado que cuando los tensioactivos se aplican de manera tópica inducen cambios bioquímicos responsables de la irritación en la piel debido a su capacidad de interactuar con los lípidos de ésta.

Los tensioactivos aniónicos son los más comunes en productos de limpieza corporal y pueden dañar tanto las proteínas como los lípidos de la piel, dando lugar a tirantez de la piel después del lavado, sequedad, daños en la barrera protectora, irritación e incluso picor. La unión de los tensioactivos a la queratina de la piel y la desnaturalización de las proteínas dañan la membrana y estos fenómenos están directamente relacionados con la inducción de respuestas cutáneas. La eliminación de la capa de lípidos de la piel provoca la exposición de nuevos puntos de unión a la queratina, hecho que potencia la adsorción de los tensioactivos (Effendy y Maibach, 1995). Con el fin de proporcionar beneficios para

el cuidado de la piel, los productos de limpieza corporal deben minimizar primero el daño que los tensioactivos provocan.

La irritación dérmica es uno de los efectos adversos inducidos por productos químicos más comunes en el hombre. En términos clínicos, representa aproximadamente un 70 % de todos los casos de dermatitis por contacto (Wahlberg, 1996). La presencia de eritema, edema, sequedad de la piel, fisuras, descamación, picor y dolor caracterizan tanto la dermatitis por contacto como la dermatitis alérgica por contacto. Algunos de estos signos son indicadores de reacciones alérgicas y alteración de la homeostasis y conjuntamente, representan la manifestación fisiológica de una compleja cadena de respuestas bioquímicas, vasculares y celulares posteriores a la señal inicial de irritación (Weltfriend y col., 1996). Debido a su gran incidencia, es importante evaluar el potencial efecto irritante dérmico de todos los compuestos químicos que pueden entrar en contacto con la piel, como es el caso de los tensioactivos estudiados en esta Tesis.

Tal como se ha comentado anteriormente, la valoración del efecto irritante de nuevos productos tiende cada vez más a realizarse en modelos *in vitro* y en ese sentido, los métodos basados en cultivos celulares se han ido introduciendo progresivamente con ese fin. La variabilidad potencial de los cultivos primarios hace que la comparación de los resultados sea difícil (Guillot, 1992). En cambio, el empleo de líneas celulares establecidas como sistemas *in vitro* está muy extendido debido a su homogeneidad y a su fácil manejo (Benassi y col., 1999; van de Sandt y col., 1999; Roguet, 1999; Lee y col., 2000) y han demostrado ser útiles para evaluar la seguridad de diversos compuestos químicos. Además, resultan eficientes para evaluar la irritación dérmica y sobretodo, eliminan la necesidad de disponer de piel humana o animal (Korting y col., 1994a; Osborne y Perkins, 1994; Lawrence, 1997; Benassi y col., 1999; van de Sandt y col., 1999; Wilhelm y col., 2001; Lee y col., 2000; Moreno, 2000; Benavides y col., 2004a, 2004b).

Entre las células de la piel, los queratinocitos, debido a su localización en la epidermis, desempeñan un papel fundamental en el proceso de irritación dérmica, su importancia en el mantenimiento de la integridad del estrato córneo y además, tienen la capacidad de sintetizar y liberar múltiples mediadores inflamatorios (Ward y col, 1998, van de Sandt y col., 1999; Corsini y Galli, 2000) de manera que tras ser estimulados por agentes exógenos como la luz UV o agentes químicos desencadenan diversas respuestas inflamatorias (Steinhoff y col., 2001). También los fibroblastos, las células endoteliales y las células inmunológicas residentes en la dermis participan en las reacciones inmunológicas (Moreno, 2000; Coquette y col., 1999, 2000).

Debido a su implicación en el proceso de irritación y considerándolas modelos *in vitro* apropiados se han seleccionado dos líneas celulares de queratinocitos (queratinocitos humanos NCTC 2544 y queratinocitos inmortalizados HaCaT) y una de

fibroblastos (fibroblastos de ratón 3T6) para realizar los ensayos de citotoxicidad con el objetivo de predecir la irritación dérmica inducida por los tensioactivos derivados de lisina.

Para evaluar los efectos de los tensioactivos sobre la viabilidad celular se utilizaron dos ensayos de citotoxicidad *in vitro*: el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (MTT, en sus siglas en inglés) y el de captación de rojo neutro (NRU, en sus siglas en inglés). Ambos métodos fueron usados como medida indirecta para predecir la irritación dérmica. Los ensayos de citotoxicidad están entre los métodos más comunes utilizados para predecir la toxicidad de sustancias en varios tejidos y tipos celulares (Triglia y col., 1991; Korting y col., 1994b; Wilhelm y col., 2001; Benavides y col., 2004a, 2004b). La capacidad de un compuesto químico para provocar irritación puede predecirse con éxito utilizando criterios de valoración basados en la citotoxicidad ya que son representativos del grado de daño o lesión causado por un compuesto químico (Lawrence, 1997; van de Sandt y col., 1999). Asimismo, es importante estudiar en profundidad la respuesta de los mecanismos celulares tras la exposición a compuestos químicos (Wilhelm y col., 2001; Pappinen y col., 2005) para predecir el efecto irritante de los mismos.

Los tensioactivos derivados de lisina se compararon con tensioactivos comerciales de los que se conoce su efecto irritante *in vivo* debido a su amplia utilización: uno anfótero y poco irritante, la tegobetaína (TGB); uno aniónico e irritante, el dodecil sulfato sódico (SDS, en sus siglas en inglés), y uno catiónico y muy irritante, el bromuro de hexadecil trimetilamonio (HTAB, en sus siglas en inglés). Tradicionalmente, el tensioactivo SDS ha sido el más utilizado en productos de cuidado personal como sustituto de los jabones comunes y también en las investigaciones sobre irritación dérmica (Singer y Tjeerdema., 1993; Effendy y Maibach, 1995; Lee y Maibach, 1995). Además, forma parte de numerosas preparaciones farmacéuticas (Swinyard y Lowenthal, 1990).

En todos los experimentos de citotoxicidad en los cultivos celulares, los tensioactivos derivados de lisina presentaron valores de CI_{50} (concentración de tensioactivo que provoca la disminución de la viabilidad celular en un 50 %) superiores a los del tensioactivo aniónico de referencia y a los del HTAB ($P < 0,05$). Estos resultados nos permiten considerar a los tensioactivos derivados de lisina como menos irritantes dérmicos que los comerciales.

En las líneas de queratinocitos NCTC 2544 y fibroblastos, los derivados de lisina mostraron valores similares a los obtenidos para la TGB (Tabla 1, Artículo 1), tensioactivo anfótero considerado poco irritante, aliviante de los efectos irritantes del SDS y presente en la mayoría de preparaciones cosméticas (Rigano y col., 2000). En cambio, en células HaCaT, resultaron menos citotóxicos como muestran sus elevados valores de CI_{50} (Tabla 1, Artículo 2) y por tanto, menos irritantes que la TGB. En HaCaT, se ha calculado el índice N para ambos ensayos de citotoxicidad con el objetivo de representar cuantas

veces es más citotóxico un tensioactivo respecto al SDS (Figura 2, Artículo 2). Los resultados muestran que la citotoxicidad de los derivados de lisina está entre 4 y 6 veces por debajo de la del SDS y por tanto, son mucho menos irritantes que éste.

Por otro lado, cuando comparamos los valores de citotoxicidad obtenidos en las tres líneas celulares, se observan diferencias hacia los tensioactivos de estudio. En general, fueron menos citotóxicos en queratinocitos NCTC 2544 que en fibroblastos y menos aún en células HaCaT. La diferencia de resultados observada entre las líneas celulares podría ser debida a diferente sensibilidad como se ha observado en otros estudios (Dickson y col., 1993; Kortling y col., 1994a; Clothier y col., 1999; Benavides y col., 2004a).

Los queratinocitos, debido a su localización en la epidermis, suelen ser más resistentes que los fibroblastos ya que están constantemente expuestos a los agentes externos. Las líneas celulares también pueden presentar diferente sensibilidad debido a su origen ya que los queratinocitos son de origen epidérmico (Ree y col., 1981; Boukamp y col., 1988) mientras que los fibroblastos proceden de células embrionarias de ratón (Todaro y Green, 1963). Las células transformadas con virus presentan una baja capacidad para diferenciarse, como es el caso de la línea celular NCTC 2544 (Ree y col., 1981), que solo forman monocapas en cultivo y carecen de marcadores epidérmicos específicos. En cambio, las células HaCaT (Boukamp y col., 1988; Breitkreutz y col., 1991, 1998) derivan de queratinocitos humanos normales (NHK, en sus siglas en inglés) y presentan una capacidad de diferenciación comparable con ellos cuando crecen en cultivo sumergido. Su similitud con los NHK humanos normales las hace buenas candidatas para evaluar la irritación dérmica bajo condiciones de cultivo convencionales. Además, los ensayos con la línea celular HaCaT proporcionan una buena reproducibilidad intra- e interlaboratorio (Spielmann y col., 1998) además de asegurar una buena correlación *in vivo* para diferentes series de homólogos de tensioactivos aniónicos (Wilhelm y col., 1994).

Los fibroblastos 3T6 se han utilizado en lugar de los 3T3 que se emplean en el ensayo validado de fotohemólisis ya que morfológica y funcionalmente son muy similares a los 3T3 y además son muy utilizados en estudios de citotoxicidad y de irritación dérmica (Moreno, 2000; Benavides y col., 2004a; Ilio y col., 2006).

Naturalmente, no todos los tensioactivos tienen la misma capacidad para inducir irritación dérmica debido a su diferente estructura química, si bien la relación entre su estructura química y su actividad irritante no es del todo conocida. En general, los tensioactivos aniónicos son fuertes irritantes para la piel humana y animal (Lansdown y Grasso, 1972, Wilhelm y col., 1994, Barany y col., 1999), los catiónicos son al menos igual de irritantes (Effendy y Maibach, 1995) pero más citotóxicos que los aniónicos (Kortling y col., 1994a; Benavides y col., 2004a, 2004b), mientras que los no iónicos presentan un

menor potencial irritante (Rigano y col., 2003; Kolodziejska, 2005). Los tensioactivos derivados de lisina, a pesar de ser aniónicos, mostraron un efecto citotóxico mucho menor que el SDS y el HTAB y similar al de la TGB, sugiriendo que su acción irritante dérmica es similar a la de este último. La menor acción irritante de nuestros tensioactivos en comparación con otros tensioactivos aniónicos podría ser debida a su estructura química derivada del aminoácido lisina.

Las propiedades de los tensioactivos parecen ser un factor decisivo en las reacciones irritantes producidas en la piel (Effendy y Maibach, 1995; Macián y col., 1996; Barany y col., 1999; Nicander y col., 2003). Se han propuesto varias características que, combinadas o por separado, podrían estar implicadas en su efecto irritante como la CMC, la estructura de la cadena alquílica o los grupos funcionales (Effendy y Maibach, 1995; Vinardell y Infante, 1999). Además, el efecto irritante está relacionado no solo con las propiedades químicas de la molécula (peso molecular, polaridad, estado de ionización, vehículo), que influyen en la absorción dérmica, sino también con la concentración aplicada, el tiempo de exposición, etc. (Berardesca y Distanti, 1994).

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la relación estructura-efecto irritante, hemos estudiado la influencia de la naturaleza de los contraiones incorporados a la estructura de los tensioactivos en su potencial efecto irritante. En las tres líneas celulares seleccionadas, los tensioactivos con contraiones orgánicos en su estructura (77KK y 77KT) presentaron una tendencia a ser menos citotóxicos y por tanto, menos irritantes dérmicos que los tensioactivos con contraiones inorgánicos (77KP, 77KS y 77KL), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos. Según estos resultados parece ser que la presencia de diferentes contraiones en las moléculas de tensioactivo influye en su acción citotóxica. Algunos estudios han destacado la importancia de las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos como responsables de la inducción de su efecto irritante (Vinardell y Infante, 1999; Vives y col., 1997, 1999; Morán y col., 2001a; Perani y col., 2001; Mitjans y col., 2003) y también de la influencia del contraión en las propiedades biológicas de los tensioactivos (Kleszczynska y Sarapuk, 1998; Benrraou y col., 2003; Haldar y col., 2005). Estudios previos con algunos de los tensioactivos estudiados en esta Tesis sobre la inducción de apoptosis y necrosis celular, realizados con la línea celular U937, concluyeron que el tensioactivo 77KT presentaba una actividad apoptótica y necrótica menor (Maugras y col., 2001). Estos resultados concuerdan con la baja citotoxicidad que hemos observado para los tensioactivos con contraión orgánico.

En muchas ocasiones, la simple determinación de la citotoxicidad, no siempre permite predecir qué compuestos son irritantes y cuáles no irritantes (Fentem y col., 2001) y por eso es necesario utilizar otros marcadores adicionales, como la distribución diferencial (liberación y almacenamiento) de citocinas.

Los principales mecanismos por los que las células epidérmicas participan en las reacciones inmunitarias e inflamatorias de la piel son la producción de citocinas y la respuesta a las mismas (William y Kupper, 1996). Las citocinas constituyen una familia heterogénea de glicoproteínas inducibles, producidas por varios tipos celulares, que median la interacción local y la comunicación a distancia entre diferentes tipos celulares implicados en las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Las citocinas pueden actuar de manera directa como: inductores y reguladores del crecimiento celular, estimuladores de la migración celular, y controladores de la función celular y de la interacción a través de cambios en la expresión de las moléculas de adhesión y de los receptores de citocinas (Corsini y Galli, 1998). El complejo fenómeno de la irritación dérmica comprende diversos factores y tipos celulares, como las células epidérmicas, los fibroblastos, las células endoteliales y los leucocitos que invaden la zona interactuando con diferentes células bajo el control de las citocinas y de los mediadores lipídicos. Es evidente que la liberación de varias sustancias químicas en la comunicación célula-célula es la responsable del control de las reacciones inflamatorias e inmunitarias de la piel (Coquette y col., 2000).

Los queratinocitos, que representan el 95 % de las células de la epidermis, tienen como función principal la de proporcionar y mantener la integridad estructural del estrato córneo y además, juegan un papel muy importante en la iniciación y mantenimiento de las reacciones inflamatoria e inmunológica a través de la producción de citocinas (McKenzie y Sauder, 1990). Una gran variedad de estímulos ambientales como la luz UV y los agentes químicos pueden estimular a los queratinocitos a liberar citocinas inflamatorias, quimiotácticas y promotoras del crecimiento. De todas las citocinas producidas por los queratinocitos, solo la IL-1 α y el TNF- α activan un número suficiente de mecanismos efectores que desencadenan el proceso de inflamación dérmica (Kupper, 1990). Los queratinocitos contienen grandes cantidades de citocina proinflamatoria IL-1 α biológicamente activa en su citoplasma que puede ser liberada en respuesta a un amplio abanico de estímulos. Esta citocina es conocida como el iniciador principal de la cascada inflamatoria ya que es capaz de activar un número suficiente de efectores para desencadenar por sí misma un proceso inflamatorio (Nickoloff y Naidu, 1994; Coquette y col., 2000; Corsini y Galli, 2000). Por ese motivo, está ampliamente aceptado que la IL-1 α constituye un marcador temprano de irritación tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* (Muller-Decker y col., 1994; Corsini y col., 1996; Corsini y Galli, 1998). Por ello, se ha elegido la línea celular de queratinocitos NCTC 2544 para llevar a cabo las determinaciones de IL-1 α (intra y extracelular) tras someter las células a tratamiento con los tensioactivos derivados de lisina. El tensioactivo aniónico SDS se ha utilizado como control con propósitos comparativos.

Evidentemente, los tensioactivos son capaces de perturbar las membranas celulares dando lugar a la liberación del citoplasma celular (Osborne y Perkins, 1994; de

Brugerolle de Fraisinette, 1999), acción que provoca la liberación de citocina IL-1 α almacenada en el interior de la célula al medio extracelular. Al aumentar su concentración, todos los tensioactivos fueron capaces de aumentar la cantidad de citocina intracelular hasta alcanzar un nivel que provocaba la liberación de la citocina almacenada en el interior celular al medio de cultivo debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular. Los resultados relativos a la liberación de IL-1 α por parte de los tensioactivos mostraron también una dependencia de la concentración, es decir, a mayor concentración de tensioactivo, mayor liberación de IL-1 α . Para estimular la síntesis de IL-1 α y provocar su liberación al medio de cultivo, se necesitan concentraciones mayores de los tensioactivos derivados de lisina (Figura 2, Artículo 4) que del tensioactivo aniónico de referencia (Figura 3, Artículo 4) indicando que los derivados de lisina son menos irritantes. El SDS es el tensioactivo con mayor capacidad de aumentar la producción de IL-1 α ($P < 0,05$), hecho que confirma su elevado potencial irritante.

Para comparar los tensioactivos entre sí, se calcularon las concentraciones de tensioactivo que incrementan en un 50 % la IL-1 α intracelular (CE_{50}), de manera que cuanto mayor es esta concentración, menor es la capacidad de inducir la síntesis de la citocina (Tabla 1, Artículo 4) y por ello, los tensioactivos se suponen menos irritantes. Los valores de CE_{50} de los tensioactivos derivados de lisina fueron superiores a la CE_{50} del SDS ($P < 0,05$), siendo el tensioactivo 77KT el que mostró una menor capacidad de incrementar la IL-1 α intracelular. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tensioactivos según el tipo de contraión, aunque se aprecia una ligera tendencia de los tensioactivos 77KT y 77KK a estimular en menor medida la síntesis de la citocina. Estos resultados concuerdan con la baja citotoxicidad que inducen estos tensioactivos.

4.2. Evaluación del potencial efecto fotoirritante: Ensayo de fotohemólisis

El riesgo de lesiones en la piel a consecuencia de la exposición solar se ha convertido en un hecho preocupante en los últimos años debido a un incremento de la exposición solar y a la disminución de la capa de ozono. La exposición aguda y crónica a los rayos solares promueve el envejecimiento de la piel, eritema, inflamación, inmunodepresión y fotocarcinogénesis, cuyas causas se han atribuido a la producción de radicales libres (López-Torres y col., 1998). Se ha demostrado que la luz UVB atraviesa el plexo capilar en la dermis e interacciona directamente con los eritrocitos (Kollias y col., 1992) con un posible riesgo de fotohemólisis y propagación de especies pro-oxidantes. De ahí la importancia de utilizar cremas solares protectoras adecuadas y que contengan ingredientes no fototóxicos para garantizar una óptima protección frente a los rayos solares.

La evaluación de la fotoirritación de nuevos compuestos es esencial para valorar el posible daño o las lesiones que se podrían producir en la piel tras la exposición solar. Tradicionalmente, dicha evaluación se ha realizado en animales, sobretodo en conejos (Spielmann y col., 1994a). En Europa, desde el año 2000, no está permitido evaluar el potencial fototóxico agudo en animales ya que ha sido aceptado el ensayo de fototoxicidad en fibroblastos 3T3-NRU. Como consecuencia, se ha establecido un consenso por el cual la evaluación del potencial fototóxico agudo ha de realizarse mediante métodos *in vitro*. Además del ensayo validado, existen dos métodos *in vitro* adicionales que han revelado resultados prometedores. Uno de ellos es el ensayo de fototoxicidad en eritrocitos o fotohemólisis (Pape y col., 1994).

En vistas de una potencial aplicación de los tensioactivos derivados de lisina en cremas solares u otros preparados de aplicación tópica y para completar las pruebas de irritación realizadas, se ha evaluado su fototoxicidad mediante el ensayo de fotohemólisis en eritrocitos humanos. Se han incluido dos compuestos como controles: uno no fotoirritante, el SDS, y otro fotoirritante, la clorpromacina (Eberlein-Konig y col., 1997; Pape y Pfannenbecker, 1994). Este método permite valorar el potencial fototóxico de algunos compuestos químicos por su capacidad de perturbar la membrana del eritrocito, oxidar la hemoglobina o ambas, bajo la exposición a la luz ultravioleta (Pape y col., 2001). Es un método útil para obtener información del mecanismo de fototoxicidad y sencillo debido a la fácil obtención y manipulación de los eritrocitos. Además, se puede utilizar a altas dosis de UVB, lo que permite una exposición prolongada a todo el espectro solar (Spielmann y col., 2000).

Los resultados obtenidos en el ensayo de fotohemólisis tras la exposición a la luz UV (UVA: 6,9 J/cm² y UVB: 1,58 J/cm²) indican que los tensioactivos derivados de lisina no presentan acción fototóxica ya que la CH₅₀ en eritrocitos irradiados (+UV) y no irradiados (-UV) fueron muy similares (Figura 3, artículo 2) a pesar de los altos niveles de UVB a que fueron expuestos los eritrocitos. Como se muestra en dicha figura, la CH₅₀ (+UV) de la clorpromacina disminuye significativamente respecto a la CH₅₀ (-UV), confirmando su efecto fotoirritante. Los resultados sugieren la posible utilización de estos tensioactivos en formulaciones cosméticas o farmacéuticas de aplicación tópica, incluidas las cremas solares protectoras, ya que han demostrado no ser fototóxicos.

4.3. Evaluación del potencial efecto irritante ocular mediante el ensayo de hemólisis

Los tensioactivos también pueden provocar irritación ocular, ya sea de manera intencionada, debido a que están presentes como excipientes en muchos preparados oftálmicos y en preparados que se aplican en las proximidades del ojo y sus estructuras adyacentes, o bien de manera accidental como consecuencia de la utilización habitual de

múltiples productos cosméticos, limpiadores, etc. de los que también forman parte. La irritación ocular inducida por sustancias químicas supone la exposición directa de estructuras como la córnea, el iris y la conjuntiva.

El grado de lesión causado por un agente externo en la mucosa ocular depende del pH, la capacidad de unión a proteínas epiteliales y de la penetración de éste en la córnea. Cuando una sustancia irritante penetra en el ojo, se activan una serie de mecanismos protectores: la secreción de lágrimas aumenta y los vasos sanguíneos se dilatan para eliminar o reducir la presencia del compuesto en cuestión. Si la irritación es severa, la dilatación de los vasos hace que el fluido vascular y las proteínas se filtren hacia la conjuntiva causando edema y el funcionamiento de los párpados queda alterado. Las lesiones directas a nivel de iris se caracterizan por: incremento de la vascularización, engrosamiento del estroma, disminución de la reacción a la luz, inflamación acuosa y/o destrucción del grosor del tejido (Wallace, 2001). Cualquier lesión en los ojos puede causar alteraciones de la visión y si es muy severa, puede llegar a provocar la pérdida de ésta. Por tanto, resulta esencial evaluar los efectos oculares de los compuestos antes de la exposición a los mismos.

Se han propuesto muchos ensayos *in vitro* para la valoración de la irritación ocular como alternativa al ensayo de Draize (Herzinger y col., 1995; Gettings y col., 1996; Curren y Harbell, 1998, 2002; Balls y col., 1999; Eskes y col., 2005). Muchos de estos ensayos *in vitro* son reduccionistas, es decir, tienden a basarse solo en una parte del complejo proceso de la irritación ocular. Esto ha llevado a una situación en la que un ensayo *in vitro* que capaz de medir un solo tipo de daño o lesión específicos, se compara con la puntuación del ensayo de Draize, que abarca diferentes tipos de lesión en córnea, iris y conjuntiva. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que cuanto más reduccionista sea un método *in vitro*, es más probable que sólo responda a ciertas clases de compuestos químicos que causen irritación ocular por el mismo mecanismo. De esta manera, únicamente se podrán predecir algunos tipos de lesión o daño ocular mediante cada ensayo *in vitro*. En este sentido, el ensayo de hemólisis (Pape y col., 1987) resulta especialmente útil para evaluar ciertas clases de sustancias químicas que pueden dañar las membranas plasmáticas y desnaturalizar las proteínas de membrana y otras proteínas, como los compuestos tensioactivos. Estos fenómenos se pueden correlacionar con la respuesta inicial del proceso de inflamación y con los cambios en la conformación de las proteínas, tales como los cambios observados en la opacidad de la córnea observada tras la exposición a determinados compuestos químicos.

El potencial efecto irritante ocular de los tensioactivos aniónicos derivados de lisina se ha evaluado mediante el ensayo de hemólisis, que es específico para evaluar tensioactivos o formulaciones que los contengan y ha sido propuesto como alternativa fiable al ensayo de Draize ocular para este tipo de compuestos químicos debido a su

buena correlación con los datos obtenidos *in vivo* (Pape y Hoppe, 1991; Sugai y col., 1991, 1993; Okamoto y col., 1999; Pape y col., 1999). Además, los eritrocitos constituyen un modelo celular ampliamente utilizado como diana para evaluar la irritación ocular.

En este ensayo, también se han utilizado tres tensioactivos comerciales (SDS, TGB y HTAB) con propósitos comparativos. Los efectos adversos de los tensioactivos en la membrana plasmática se determinaron mediante los valores de CH_{50} (concentración de tensioactivo que provoca el 50 % de hemólisis) en combinación con el daño a las proteínas celulares liberadas mediante el cálculo del índice de desnaturalización (ID). Ambos criterios se correlacionan con los daños observados en la conjuntiva (hemólisis) y la opacidad corneal (desnaturalización). A partir de los resultados de CH_{50} e ID es posible calcular la relación L/D (Tabla 2, artículo 2) que se utiliza en lugar de la puntuación en la fase aguda de la evaluación *in vivo* y permite clasificar los tensioactivos (Pape y col., 1987).

A partir de los resultados de este ensayo, se observa claramente que los tensioactivos derivados de lisina son menos hemolíticos y poseen menor capacidad para desnaturalizar la hemoglobina que los comerciales ($P < 0,05$). Según la relación L/D, los tensioactivos derivados de lisina se pueden clasificar como ligeramente irritantes a nivel ocular. Al igual que en la evaluación del potencial irritante dérmico, se observa una tendencia de los tensioactivos con contraíón orgánico (77KK y 77KT) a ser menos hemolíticos y por tanto, potencialmente menos irritantes oculares que los tensioactivos con contraíón inorgánico. El tensioactivo 77KT fue el menos hemolítico de los tensioactivos con contraíón orgánico ($P < 0,05$) y el 77KL, de los tensioactivos con contraíón inorgánico ($P < 0,05$).

4.4. Evaluación de la toxicidad acuática: Ecotoxicidad en *Daphnia magna*

Como consecuencia de sus múltiples aplicaciones, los tensioactivos están presentes en la mayoría de aguas residuales domésticas y procedentes de la actividad industrial (Swisher, 1991), y en los sedimentos (Holt y col., 1995; CCPCT, 2000). También se pueden encontrar en aguas superficiales y subterráneas (Tabor y Barber, 1996), y en el agua potable (CCPTC, 2000) debido a su elevada polaridad (Ankley y Burkhard, 1992). La presencia de los tensioactivos en los ecosistemas acuáticos supone una amenaza ya que pueden alcanzar niveles perjudiciales para los organismos acuáticos (Altenburger y col., 1996; Zakrzewski, 2002) tal como se ha demostrado en las cadenas alimentarias acuáticas (algas, crustáceos y peces) (Talmage, 1994). Por tanto, es necesario evaluar su toxicidad acuática para predecir su potencial impacto medioambiental y también resulta útil determinar la relación entre la estructura química de un tensioactivo y sus efectos en el medioambiente para orientar el diseño de tensioactivos más ecológicos. Estas consideraciones han propulsado la síntesis de nuevos tensioactivos derivados de

aminoácidos de los que se espera que además de ser poco irritantes, también sean respetuosos con el medioambiente, debido a su estructura análoga a compuestos naturales.

Tradicionalmente, la mayoría de las evaluaciones de los efectos tóxicos de los compuestos químicos se han centrado en la preocupación relativa a la seguridad en el hombre y su salud. El reconocimiento de que existen importantes implicaciones para la salud humana en cuanto a la respuesta a los xenobióticos por parte de animales que se encuentran en su propio ambiente, ha impulsado a la disciplina de la ecotoxicología, poniendo especial énfasis en el estudio de bioindicadores de la salud de un ecosistema (Wallace, 2001).

La toxicidad acuática aguda de los tensioactivos derivados de lisina se ha evaluado utilizando como modelo el ensayo de inmovilización aguda en el invertebrado acuático *Daphnia magna*. El tensioactivo 77KP no se pudo evaluar debido a la falta de solubilidad en el medio de ensayo. Como tensioactivo de referencia se ha escogido el SDS por su carácter aniónico. Además, los compuestos tóxicos de referencia se utilizan a menudo para determinar la "salud" de las especies del ensayo. No existe un compuesto que sea el más ampliamente utilizado pero entre los más usados están el SDS, el cloruro sódico, el pentaclorofenol sódico y el cloruro de cadmio (Wallace, 2001).

Durante los últimos años, la especie *Daphnia magna* viene siendo utilizada como bioindicador de aguas contaminadas y los efectos que diferentes agentes ejercen sobre ella están siendo ampliamente estudiados (Cserhádi y col., 2002; Zakrzewski, 2002; Coors y col., 2004; Emmanuel y col., 2005; Hodges y col., 2006). Evidentemente, la evaluación de la toxicidad bajo condiciones medioambientales reales es un trabajo mucho más complejo que la determinación de los efectos de compuestos químicos en una única especie bajo condiciones controladas de laboratorio, si bien la información obtenida en este tipo de estudios proporciona una valiosa información que siempre se puede completar con un estudio medioambiental más amplio. Los estudios de toxicidad aguda con invertebrados nos sirven para determinar los límites de seguridad de los compuestos. Además, muchos datos indican que *Daphnia magna* es una de las especies más utilizadas y más sensibles a la contaminación por tensioactivos (Lewis y Surprenant, 1983; Verge y Moreno, 2000; Guilhermino y col., 2000; Sandbacka y col., 2000).

Los resultados de Cl_{50} (concentración de tensioactivo que causa la inmovilización del 50 % de la población de *Daphnia*) obtenidos tras 24 y 48 horas de exposición a los tensioactivos mostraron que los tensioactivos 77KT y 77KL fueron los menos tóxicos de los tensioactivos estudiados, como demuestran sus elevados valores de Cl_{50} , aproximadamente entre 6 y 10 veces superiores a los de 77KK y 77KS. Los valores obtenidos para el SDS fueron similares a los descritos en la literatura (Sandbacka y col.,

2000; Emmanuel y col., 2005), lo que demuestra que los ejemplares de *Daphnia magna* se encuentran en buen estado de "salud".

Otros estudios de toxicidad acuática de tensioactivos en *Daphnia magna*, tras 48 h de exposición, han revelado que la toxicidad aguda varía de 1,7 a 270 mg/l para los aniónicos alquil benceno sulfonatos, de 1,0 a 6,8 mg/l para los no iónicos alquil etoxilatos y de 0,1 a 58 mg/l para el catiónico cloruro de cetilpiridinio (Lewis y Surprenant, 1983; Verge y Moreno, 2000). Los valores obtenidos en nuestros experimentos a 48 h están dentro de los rangos determinados para los tensioactivos aniónicos, y los tensioactivos 77KT y 77KL son los que están más próximos al valor máximo de toxicidad de 270 mg/l.

La relación entre estructura química, parámetros fisicoquímicos, actividad biológica e impacto ambiental de los tensioactivos no se conoce bien (Cserhádi y col., 2002). Se han publicado varios estudios acerca de relaciones estructura química-actividad (QSAR) en la toxicidad acuática inducida por tensioactivos (Dyer y col., 2000; Uppgard y col., 2000; Davies y col., 2004). Estos autores concluyeron que la toxicidad se correlaciona básicamente con su hidrofobicidad y no con parámetros específicos de los tensioactivos, de manera que al aumentar la longitud de la cadena alquílica, aumentaba también su toxicidad aguda. En nuestro caso, los tensioactivos tienen dos cadenas de la misma longitud por lo que, el efecto tóxico no se puede atribuir a los cambios en su longitud. Tampoco, se observa relación entre el tipo de contracción de los derivados de lisina y la toxicidad acuática que provocan.

Otros estudios indican que el efecto tóxico inducido por los tensioactivos en organismos acuáticos se debe a su tendencia a adsorberse en sus tejidos y atravesar las membranas como consecuencia de su capacidad para perturbarlas (Rosen y col., 1999).

Las concentraciones de tensioactivos escogidas fueron inferiores a su CMC (Tabla 1, Artículo 3). Por tanto, podemos concluir que los monómeros de tensioactivo y no las micelas fueron responsables de la acción tóxica como se sugiere en otros estudios con tensioactivos (Rosen y col., 1999, 2001).

4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Muchos tensioactivos han demostrado ser buenos agentes antimicrobianos (Wade y Addy, 1992; Birnie y col., 2000; Pérez y col., 2002; Haldar y col., 2005; Rauter y col., 2005) debido a su capacidad para interaccionar y perturbar las membranas citoplasmáticas por la naturaleza hidrófoba de sus cadenas apolares (Kanazawa y col., 1995; Ahlstrom y col., 1999; Keifer y col., 2004). En vistas de potenciales aplicaciones en preparaciones tópicas de los tensioactivos derivados de lisina debido a su bajo potencial irritante, también es interesante conocer sus propiedades antimicrobianas con el fin de

ampliar el número de aplicaciones. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los derivados de lisina en base a su concentración mínima inhibitoria (MIC, en sus siglas, en inglés) (Woods y Washington, 1995) mediante el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana, utilizando una batería de bacterias gram-negativas, gram-positivas y levaduras. Tras la exposición de los microorganismos a los tensioactivos, se determinaron los valores de MIC capaces de inhibir el crecimiento de los cultivos microbianos (Tabla 2, Artículo 3). Todos los tensioactivos fueron inactivos frente a las bacterias (MIC > 512 µg/ml) excepto en el caso de la gram-negativa *Bordetella bronchiseptica* (MIC = 128 µg/ml) (dato no publicado). En cambio, fueron muy activos frente a las levaduras, sobretodo contra *Candida tropicalis*. En ningún caso se observan diferencias atribuibles al tipo de contraión.

Por su baja actividad antibacteriana, estos tensioactivos no se utilizarán como desinfectantes o antisépticos. Sin embargo, tanto en higiene personal como en la industria cosmética, la combinación de una baja actividad antibacteriana junto con las propiedades emulsionantes y poco irritantes es deseable a fin de limpiar y a la vez causar la menor alteración posible de la flora normal de la piel y del balance de humedad (Hill y Rhode, 1999).

Por otro lado, los valores de MIC determinados para los tensioactivos derivados de lisina fueron inferiores a sus CMC en agua (Tabla 1, Artículo 3) y por tanto, los monómeros y no los agregados fueron responsables de la actividad antimicrobiana (Xia y col., 1995; Kopecky, 1996; Birnie y col., 2000). Aunque se pueden formar algunas micelas a concentraciones por debajo de la CMC, no es probable que sean tan importantes como para provocar un efecto sobre las células (Birnie y col., 2000).

4.6. Estudio de la interacción de los tensioactivos con las membranas celulares: resistencia osmótica y fluidez de membrana

Otro mecanismo por el cual las sustancias químicas pueden provocar irritación incluye la alteración de la bicapa lipídica de las membranas celulares. A concentraciones subtóxicas, la interacción de sustancias irritantes con las membranas o con los lípidos del estrato córneo podría dar lugar a efectos significativos. La interferencia de irritantes con la membrana celular puede modificar su fluidez (Fulbright y col., 1997; Zavodnik y col., 1997), repercutiendo en la transducción de la señal mediada por receptor (Rosette y Karin, 1996; Aragane y col., 1998), favoreciendo o iniciando el proceso de irritación.

Cuando los tensioactivos entran en contacto con la piel o los ojos, lo hacen también con las membranas celulares del tejido y por tanto, con la bicapa lipídica de las membranas, intercalándose entre los lípidos de ésta, ya que constituyen la principal diana en la interacción con los tensioactivos. Como resultado de esta interacción, la parte

hidrófoba del tensioactivo se ancla en la fase lipídica de la membrana y la hidrófila permanece en la región polar (Zachowski y Durand, 1988; Deuticke y col., 1990; Przystalski y col., 2000). Dicha interacción puede ocasionar varios efectos dependiendo de las características químicas de los tensioactivos (forma molecular, tamaño, carga...), que son capaces de inducir alteraciones en las membranas celulares que podrían intervenir en el proceso de irritación (Partearroyo y col., 1990; Ross y col., 2004).

La lisis celular provocada por los tensioactivos es un proceso de enorme importancia práctica. Por eso, uno de los requisitos fundamentales para el desarrollo de tensioactivos en sistemas farmacéuticos (Ryoo y col., 2005), alimentarios (Borowy-Borowski y col., 2004) y biológicos es que presenten una actividad lítica celular muy baja. El mecanismo que provoca la lisis celular aún no se conoce bien pero se sabe que influyen muchos factores como la estructura del tensioactivo, la concentración y el tipo de agregado (Berardesca y Distante, 1994; Effendy y Maibach, 1995). Muchos grupos de investigación han realizado diferentes estudios para esclarecer los procesos y los mecanismos implicados (Hägerstrand y Isomaa, 1991; Galembeck y col., 1998; Vives y col., 1999), ya que la lisis celular está muy relacionada con la toxicidad. Una mejor comprensión del fenómeno de lisis celular y los mecanismos implicados en la interacción de los tensioactivos con las membranas celulares puede ayudar y guiar en el desarrollo de nuevos tensioactivos que sean más efectivos y menos tóxicos de manera que se pueda ampliar su abanico de aplicaciones.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción de los tensioactivos con las membranas celulares se ha estudiado el efecto de los tensioactivos derivados de lisina y la posible influencia de su contraión en la protección frente a la hemólisis hipotónica (antihemólisis) y las alteraciones en la fluidez de membrana mediante anisotropía de fluorescencia. El tensioactivo SDS se ha utilizado como referencia a efectos comparativos. El SDS es uno de los tensioactivos más utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, en diferentes productos de limpieza y también en investigación bioquímica y biotecnológica (Singer y Tjeerdema, 1993).

Como modelo de estudio se ha utilizado el eritrocito ya que carece de orgánulos internos y evita las interferencias que estos podrían suponer en la interpretación de los resultados. Además, ha sido el modelo más popular utilizado para este tipo de estudios debido a su simplicidad y fácil obtención (Agre y Parker, 1989; Svetina y col., 2004).

La influencia de los tensioactivos en la protección frente a la hemólisis hipotónica se puede utilizar como índice de las interacciones con la membrana celular. Los tensioactivos interaccionan con la membrana del eritrocito de manera bifásica, es decir, protegiendo frente a la hemólisis hipotónica a concentraciones bajas y provocando hemólisis a concentraciones elevadas (Seeman, 1972; Raz y Livne, 1973; Csordas y Schauenstein,

1984; Isomaa y col., 1986; Isomaa y Hägerstrand, 1988; Galembeck y col., 1998; Vives y col., 1999).

A partir de los experimentos de hemólisis hipotónica, se ha determinado la cAH_{max} (concentración responsable de la máxima protección) (Tabla 2, artículo 4). Todos los tensioactivos estudiados protegieron frente a la hemólisis hipotónica y mostraron un comportamiento bifásico. Los valores de cAH_{max} de los derivados de lisina fueron muy próximos a sus CH_{50} obtenidas en la hemólisis y las reducciones en la hemólisis (potencia antihemolítica), similares (35 %) excepto para el 77KL (76 %). En cambio, en el caso del SDS, su cAH_{max} fue aproximadamente la mitad de su CH_{50} , mientras que su potencia antihemolítica (64 %) fue similar a la del tensioactivo 77KL. A partir de estos resultados no se observa ninguna relación entre el contraíón y el grado de protección inducido por los tensioactivos.

Para intentar esclarecer el mecanismo implicado en la antihemólisis se ha postulado que cuando los tensioactivos se intercalan en la membrana celular, incrementa el área de la membrana respecto al volumen celular (relación área de membrana/volumen celular) o la capacidad de extensión de la membrana, permitiendo a la célula alcanzar un volumen hemolítico crítico restrictivo que le permitiría alcanzar un gran volumen antes de lisar en el medio hipotónico (Machleidt y col., 1972; Seeman, 1972). Sin embargo, muchos experimentos contradicen esta hipótesis mostrando que diferentes potencias antihemolíticas no afectan el volumen hemolítico crítico (Beresford y Fastier, 1980; Eskelinen y Saukko, 1984), tal y como apoyan nuestros resultados.

Otros autores han propuesto que la reducción en la hemólisis en condiciones hipotónicas se podría explicar mediante una reorganización de los fosfolípidos de la membrana (Hägerstrand y Isomaa, 1991; Miseta y col., 1995). Para explicar la posible reorganización y movilidad de los lípidos de la membrana celular, hemos estudiado los cambios en la fluidez de membrana, parámetro que nos informa de la estructura y el estado de la membrana celular (Shinitzky y Barenholz, 1978). Se han seleccionado dos sondas fluorescentes que se sitúan en diferentes regiones de la bicapa: la DPH y la TMA-DPH (Tabla 3, artículo 5). Los resultados mostraron que los tensioactivos 77KK, 77KT, 77KP ($P < 0,01$) y SDS ($P < 0,05$) son capaces de aumentar la fluidez en la región polar de la membrana ya que los valores de anisotropía (r) de la sonda TMA-DPH son más bajos que los de la DPH respecto al control. Posiblemente, las características fisicoquímicas de estos tensioactivos como su corta longitud de cadena no les permitieron penetrar hacia el interior de la bicapa lipídica de la membrana.

Muchos compuestos que contienen contraiones en su estructura interactúan con las membranas biológicas y los modelos de membrana con diferente eficiencia (Kleszczynska y Sarapuk, 1998; Kleszczynska y col., 2005). En nuestro caso, los

tensioactivos 77KK, 77KT y 77KP incrementan la fluidez de membrana en la región externa mientras que 77KS y 77KL no mostraron efecto significativo.

Dado que los derivados de lisina no presentan la misma actividad antihemolítica ni alteran la fluidez de la membrana de la misma manera, no se puede establecer ninguna relación entre el contraíón, la capacidad antihemolítica y los cambios de fluidez de membrana provocados por estos tensioactivos. Por tanto, los tensioactivos presentan un comportamiento que no se puede atribuir a la presencia de diferentes contraiones. Como hemos visto, la interacción de los tensioactivos con la membrana celular es un proceso muy complejo, en el que numerosos factores parecen estar implicados y por eso, se requieren más estudios para esclarecer el mecanismo de interacción, entre los que se podría incluir el estudio de la proteína Banda 3 intercambiadora de aniones, implicada en la hemólisis (Sato y col., 1993) y también se tendrían que tener en cuenta las interacciones específicas entre tensioactivos-lípidos y tensioactivos-proteínas de la membrana.

Muchas de las aplicaciones de algunos tensioactivos en investigación biológica y biomédica se deben a su capacidad para solubilizar las membranas lipídicas. Estos efectos dependen tanto de la concentración total de tensioactivo como de la proporción tensioactivo-lípido presente en la membrana. Así a concentraciones bajas de tensioactivo, las membranas pierden la capacidad protectora (función barrera) y aumenta la permeabilidad (Yang y col., 1995; Anderheggen y col., 2006), mientras que a concentraciones más elevadas, generalmente por encima de la CMC, tiene lugar la lisis celular (Partearroyo y col., 1990; Malheiros y col., 2000). Las concentraciones de tensioactivo utilizadas para realizar todos los ensayos *in vitro* están por debajo de sus valores de CMC (Tabla 1, Artículo 3), indicando que los monómeros fueron los responsables de la interacción con todas las células y los causantes de los efectos sobre las mismas (Ross y col., 2004).