



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
tensioactivos 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



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia (Farmàcia)

Facultat de Farmàcia
Edifici B, escala A, 3a planta
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

M. Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo, Professora Titular de Fisiologia del Departament de Fisiologia (Farmàcia) de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memoria titulada "Influencia del contraión en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos derivados de la N^α,N^ε-dioctanoil lisina: citotoxicidad y ecotoxicidad *in vitro*" presentada por LOURDES SÁNCHEZ MOLINA para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departament de Fisiologia (Farmàcia), y considerándola finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Barcelona, el día 14 de septiembre de 2006.

Dra. M. Pilar Vinardell Martínez-Hidalgo



MINISTERIO
DE EDUCACION
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS Y AMBIENTALES DE
BARCELONA

M. Rosa Infante Martínez-Pardo, Profesora de Investigación en el Departamento: Tecnología de Tensioactivos del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona del CSIC,

INFORMA:

Que la memoria titulada "Influencia del contraión en las propiedades biológicas de tensioactivos aniónicos derivados de la N^α,N^ε-dioctanoil lisina: citotoxicidad y ecotoxicidad *in vitro*" presentada por LOURDES SÁNCHEZ MOLINA para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo mi codirección y una parte de la misma se ha realizado en el Departamento de Tecnología de Tensioactivos del CSIC bajo mi supervisión, y considerándola finalizada, autorizo su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmo la presente en Barcelona, el día 14 de septiembre de 2006.

Dra. M. Rosa Infante Martínez-Pardo

Esta tesis ha sido subvencionada por los proyectos PPQ 2000-1687-CO2-01 y PPQ 2003-01834 en el marco del Plan Nacional de Investigación y Desarrollo del Ministerio de Educación y Ciencia. Durante su realización, la autora ha disfrutado de una Beca Unidades Asociadas-CSIC (2002-2006).

A David
A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, la oportunidad de formar parte de esta Unidad Asociada y por el apoyo y dedicación mostrados en todo momento para realizar esta Tesis. A la Dra. Pilar Vinardell, por formarme en el campo de los métodos alternativos y enseñarme tantas técnicas diferentes; por tu confianza y decisión, acogerme en el grupo y darme la oportunidad de disfrutar de los congresos. A la Dra. M. Rosa Infante, por iniciarme en el mundo de la química y guiarme en la síntesis de los tensioactivos; por tu amabilidad y estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado.

También me gustaría dar las gracias a todos los amigos y compañeros que me han acompañado a lo largo de estos años:

A Montse, por tu personalidad tan alegre y ser tan buena persona. Gracias por esas risas que hemos compartido en nuestros “asuntos”. También agradecerte tu asesoramiento con el Office.

A mi “compí” y futura doctora, Vero, por tu amistad y compañerismo en nuestro trabajo diario “codo con codo”. Hemos pasado momentos divertidos y algunos no tanto pero siempre han valido la pena estando a tu lado. Decirte que te aprecio muchísimo. ¡Ánimos con tu Tesis!

A mi otra “compí” Vanessa, afectuosamente Vanessilla, que llegaste un poco más tarde al grupo pero enseguida simpatizamos. Gracias por tu gran sentido del humor y tu manera de “darme caña” en los malos momentos.

A Tomàs, por iniciarme en el mundo de los cultivos celulares y a Celia y Jaime, que aunque ya no estén en el departamento, hemos compartido muchos ratos buenos y no os olvido.

A Raquel, que siempre has tenido una sonrisa para mí y por tus grandes dosis de cariño. Siempre has estado dispuesta a ayudarme, sobre todo con los densos papeleos, *moltes gràcies!*

A M^a José, por tu creatividad y simpatía. Enseguida que llegaste al departamento te hiciste un hueco irremplazable entre nosotros.

A la futura doctora Diana Nieves, por tu amistad y esos ratos tan agradables que hemos pasado en la sala de cultivos. Si el “mundo real” no nos trata bien siempre nos quedará la danza oriental.

A Esther, ahora ya Doctora (*Enhorabona!*), por ser tan buena compañera, y por tu optimismo y gran vitalidad.

A los compañeros de “Inmuno”: Francisco, Silvia, Ana González, Carolina, Emma, Teresa y Sara. Gracias por vuestra simpatía y alegría y esos buenos momentos durante las comidas con el tupper. Nunca os olvidaré.

A Vanessa Alba, Àngels Moscatel y Pilar Serrat, por ser tan agradables y estar siempre dispuestas a ayudarnos en los aspectos logísticos.

A los profesores del departamento de Fisiología (Farmàcia) por vuestra acogida y amabilidad y especialmente a las doctoras Cristina Castellote y Àngels Franch, por vuestra disponibilidad cuando os he necesitado.

A la Dra. M. Antònia Busquets, por tu paciencia y amabilidad en nuestros interminables ratos en el fluorímetro.

A todos los compañeros del CSIC: Marta, Joedmi, Begoña, Albert, Neus, y especialmente a mi amiga Carmen, por vuestro apoyo y ayuda durante el proceso sintético y esos ratos tan agradables que pasamos juntos.

A las doctoras Lourdes Pérez y Aurora Pinazo, por vuestros consejos y aportaciones durante la síntesis de los tensioactivos.

A la Dra. M. Teresa García, por tu amabilidad y por permitirme realizar los experimentos con *Daphnia magna* y ayudarme en todo momento.

A Marta Muñoz, por tu amistad desde que éramos compañeras de Facultat y nuestras citas para comer juntas todos los viernes. Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado.

También quiero dar las gracias a mis padres y hermanos, por aguantarme y animarme aunque a veces no entendiérais qué estaba haciendo. Os quiero mucho.

Por último, a David por estar siempre a mi lado y confiar en mí. Gracias por quererme y darme ánimos en todo momento. Yo también te quiero.

A todos vosotros, ¡¡¡muchas gracias!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
1. INTRODUCCIÓN	1
Parte I	3
1. Los tensioactivos: sustancias anfífilas con capacidad autoagregante	3
1.1. Definición de tensioactivo. Características generales.....	3
1.2. Propiedades fisicoquímicas de las soluciones de tensioactivos	4
1.3. Clasificación de los tensioactivos.....	6
1.4. Evolución de los tensioactivos a lo largo del tiempo	8
1.5. Tensioactivos derivados de aminoácidos	11
1.5.1. Clasificación de los tensioactivos derivados de aminoácidos	11
1.5.2. Tensioactivos derivados del aminoácido lisina.....	13
Parte II	16
2. Riesgos que comporta el uso de tensioactivos y su evaluación	16
2.1. Irritación ocular	19
2.1.1. Ensayo de Draize ocular y críticas realizadas	20
2.1.2. Alternativas al ensayo de Draize ocular.....	23
2.1.2.1. Órganos aislados.....	23
2.1.2.2. Modelos organotípicos: métodos en membrana corioalantoidea.....	23
2.1.2.3. Modelos de tejido humano reconstituido.....	24
2.1.2.4. Métodos basados en citotoxicidad celular.....	24
2.1.2.5. Métodos basados en funciones celulares	26
2.1.2.6. Relaciones estructura-actividad para irritación ocular	26
2.1.2.7. The Low Volume Eye Test (LVET).....	26
2.1.2.8. Otros ensayos	27
2.2. Irritación dérmica	27
2.2.1. Ensayo de Draize dérmico y críticas realizadas	30
2.2.2. Alternativas al ensayo de Draize dérmico.....	30
2.2.2.1. Modelos celulares.....	31
2.2.2.2. Modelos de piel humana reconstituida.....	34
2.2.2.3. Explantes de piel y cultivo de órganos	35
2.2.2.4. Relaciones estructura-actividad para irritación dérmica	35

2.3. Fototoxicidad	36
2.3.1. Ensayo de fototoxicidad mediante captación de rojo neutro en fibroblastos 3T3 (3T3-NRU-PT).....	37
2.3.2. Ensayo de fotohemólisis (RBC-PT)	37
2.4. Ecotoxicidad acuática	38
2.4.1. Importancia de <i>Daphnia magna</i> en Ecotoxicología	42
2. OBJETIVOS	45
3. ARTÍCULOS.....	49
Artículo 1.....	51
Artículo 2.....	61
Artículo 3.....	73
Artículo 4.....	81
Artículo 5 (Manuscrito).....	101
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
4.1. Evaluación <i>in vitro</i> del potencial efecto irritante dérmico	128
4.2. Evaluación del potencial efecto fotoirritante: Ensayo de fotohemólisis	134
4.3. Evaluación del potencial efecto irritante ocular mediante el ensayo de hemólisis	135
4.4. Evaluación de la toxicidad acuática: Ecotoxicidad en <i>Daphnia magna</i>	137
4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	139
4.6. Estudio de la interacción de los tensioactivos con las membranas celulares: resistencia osmótica y fluidez de membrana.....	140
5. CONCLUSIONES.....	145
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

ABREVIATURAS

ABS	Alquil benceno sulfonatos
APG	Alquil poliglucósidos
ATP	Trifosfato de adenosina
cAH _{max}	Concentración responsable de máxima protección frente a la hemólisis hipotónica
CAM	Membrana corioalantoidea
CCPCT	Centro para productos limpios y tecnologías limpias
ECVAM	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos
CE ₅₀	Concentración de tensioactivo que incrementa en un 50 % la IL-1 α intracelular
CH ₅₀	Concentración que provoca el 50 % de hemólisis
CI ₅₀	Concentración de sustancia que causa el 50 % de inhibición de la población a estudiar (células, <i>Daphnia magna</i>)
CMC	Concentración micelar crítica
COLIPA	Asociación Europea de Perfumería, Higiene y Cosmética
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
EC	Comunidad Europea
ECETOC	Centro Europeo de Ecotoxicología y Toxicología de Compuestos químicos
EEC	Comunidad Económica Europea
FL	Ensayo de liberación de fluoresceína
FSHA	Ley Federal para las Sustancias Peligrosas
H3D-PT	Ensayo de fototoxicidad en un modelo tridimensional de piel humana
HLB	Balance hidrófilo-lipófilo
HTAB	Bromuro de hexadecil trimetilamonio
ID	Índice de desnaturalización
IL-1 α	Interleucina 1 alpha
IL-6, IL-8	Interleucina 6, Interleucina 8
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
LAS	Alquil benceno sulfonatos lineales
L/D	Relación lisis/desnaturalización
LDH	Lactato deshidrogenasa
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MTT	Ensayo de reducción de la sal de tetrazolio
NF κ B	Factor nuclear kappa de los linfocitos B
NHK	Queratinocitos humanos normales

NRR	Ensayo de liberación de rojo neutro
NRR ₅₀	Concentración de sustancia que provoca el 50 % de liberación de colorante de las células que previamente lo han captado
NRU	Ensayo de captación de rojo neutro
3T3-NRU-PT	Ensayo de fototoxicidad mediante captación de rojo neutro en fibroblastos 3T3
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PEG2	Prostaglandina 2
PIF	Factor de fotoirritación
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad
RBC-PT	Ensayo de fototoxicidad en eritrocitos o fotohemólisis
RD	Real Decreto
REACH	Registro, Evaluación y Autorización de los Compuestos químicos
RNA	Ácido ribonucleico
SCCNFP	Comité científico de productos cosméticos y productos no alimentarios destinados a los consumidores
SDS	Dodecil sulfato sódico
TE ₅₀	Tiempo de exposición a la sustancia a ensayar requerido para disminuir la viabilidad celular en un 50 %
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica
TGB	Tegobetaína
TMA-DPH	Trimetilamonio 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
TNF- α	Factor alpha de necrosis tumoral
UE	Unión Europea
UV	Luz ultravioleta
UVA	Luz ultravioleta A
UVB	Luz ultravioleta B