

76
2eq



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

BOLETIN PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

"CAPACIDAD HEMOLITICA DE DIVERSOS
TENSOACTIVOS DE INTERES FARMACEUTICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

CECILIA JOSEFINA MARTINEZ MONTES DE OCA



MEXICO, D. F.

262010

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

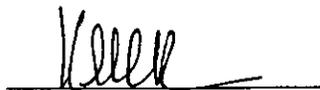
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. José Luis Ibarnea Avila
Vocal	Prof. María del Socorro Alpizar Ramos
Secretario	Prof. Ana Ingrid Keller Wurtz
1 ^{er} . Suplente	Prof. Juan Manuel Peguero Zambrano
2 ^{do} . Suplente	Prof. Sergio Rodriguez Morales

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Tecnología Farmacéutica.
Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la U. N. A. M.



Q.F.B. Ana Ingrid Keller Wurtz

Asesor del tema



Cecilia J. Martínez Montes de Oca

Sustentante

A mi padre:

Quién gracias a su trabajo y esfuerzo me dio la posibilidad de cursar una carrera universitaria, siempre con la convicción de que con educación y preparación las personas salen adelante en la vida.

A mi madre:

Que con todo su amor, comprensión, consentimiento, paciencia e ilusión del mundo, me impulsó a seguir y terminar mi carrera.

Les estaré eternamente agradecida.

A mis hermanas y hermanos:

Rosario, Gabriela, Andrés, Bernardo y Ma. Angélica

Por ayudarme, apoyarme y consentirme tanto...

Gracias a Dios

A la Q. F. B. Ana I. Keller W. :

Por darme la oportunidad de trabajar con ella, por toda su ayuda, su apoyo en todo momento, paciencia y amistad que hicieron posible la realización de esta tesis.

Infinitamente

Gracias Ana

A la Q. F. B. Ma. Del Socorro Alpizar R. :

Por su incondicional apoyo y todas las facilidades otorgadas en la elaboración de ésta tesis.

A la Facultad de Química

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Indice

	Página
Introducción	1
Capítulo I	
1. Generalidades	2
1.1. Clasificación de Agentes Tensoactivos	4
1.1.1. Aniónicos	4
1.1.2. Catiónicos	5
1.1.3. Anfotéricos	6
1.1.4. No iónicos	6
1.2. Toxicidad de tensoactivos	7
1.2.1. Toxicidad oral	7
1.2.2. Toxicidad por vía tópica	8
1.2.3. Toxicidad por vía parenteral	9
1.3. Uso de tensoactivos en productos farmacéuticos	10
1.4. Propiedades fisicoquímicas generales de tensoactivos	
no iónicos	11
1.4.1. Generales	11
1.4.2. Humectación	11
1.4.3. Espumantes	11
1.4.4. Solubilización	12
1.4.5. Emulsificación	12
1.4.6. Propiedades dispersantes	12
1.4.7. Detergencia	12
1.5. Pureza de tensoactivos	13
1.6. Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)	14
1.7. Concentración Micelar Crítica (CMC)	15

	Página
1.8. Estructura de la membranas biológicas	16
1.8.1. Características de las membranas	17
1.8.2. Lípidos de membrana	17
1.8.3. Fluidez de la membrana	20
1.9. Modelo de Mosaico Fluido	20
1.10. Eritrocitos como modelo de membrana	21
1.11. Alteraciones en la membrana inducidos por tensoactivos	22
1.11.1. Efectos de tensoactivos en el transporte de iones en eritrocitos	23
1.11.2. Alteraciones morfológicas de los eritrocitos indu- cidos por tensoactivos	24
1.12. Proceso Hemolítico	24
1.13. Actividad Hemolítica Intrínseca	25
Capítulo II Desarrollo Experimental	26
Capítulo III Resultados y Análisis de Resultados	29
Capítulo IV Conclusiones	36
Bibliografía	
Anexos I - J	

Introducción

La investigación de hemólisis producida por tensoactivos cobra mayor importancia actualmente en la industria farmacéutica, no solo para evaluar sus efectos en las membranas sino para formular nuevas formas farmacéuticas, como son las microemulsiones, geles transdérmicas y hasta liposomas.

El objetivo de este estudio fue determinar varios parámetros cuantitativos anteriormente usados y evaluar si correspondían con los valores obtenidos directamente de los experimentos. Así mismo se buscó evaluar la relación entre diversos parámetros fisicoquímicos y la toxicidad.

La hemólisis depende de numerosos parámetros experimentales, tales como la temperatura, pH, concentración de eritrocitos, concentración de tensoactivos, así como la naturaleza de iones presentes en el medio. Dependiendo de la especie, la concentración de tensoactivo requerida puede variar para causar un cierto grado de hemólisis. Debido a esos numerosos parámetros experimentales y debido a las discrepancias y la falta de información en la calidad del tensoactivo usado, pureza, etc., los resultados de numerosas investigaciones son muy difíciles de comparar.

I. Generalidades

Una molécula que ocasiona la disminución de la tensión superficial de un solvente es conocido como agente tensoactivo. Las moléculas que son parcialmente hidrofóbicas y parcialmente hidrofílicas son llamadas anfifílicas.

Los tensoactivos son moléculas anfotéricas las cuales poseen una porción soluble en solventes polares y una en solventes apolares. Se encuentran constituidos en un grupo muy heterogéneo de moléculas, en las que se incluyen hidrocarburos, pigmentos, colesterol, fosfolípidos, glicolípidos, detergentes. Contienen grupos de naturaleza alifática o aromática y muchos también contienen grupos polares. Las mitades aromáticas y alifáticas son generalmente hidrofóbicas. Estas son solubles en muchos solventes no polares pero ligeramente solubles en agua. La baja solubilidad de los grupos apolares en solución acuosa es principalmente debido a las fuerzas de interacción entre las moléculas de agua. Estas son rotas o distorcionadas si una molécula sólida es introducida.²

Los grupos polares pueden estar sustituidos con grupos cargados: como fosfato, amino, sulfato, y grupos carboxilo. Siendo polares, forman fuertes enlaces no covalentes con el agua circundante.²

Los grupos hidrofílicos en los lípidos son frecuentemente llamados cabezas y los grupos hidrofóbicos son llamados colas, particularmente cuando, son de cadenas alquílicas. Los lípidos difieren mayormente en sus porciones hidrofóbicas e hidrofílicas. En base a su comportamiento se ha elaborado su clasificación (Tabla I).²

Los tensoactivos dentro de los cuales se incluyen a los detergentes usados para la solubilización de la membrana, difieren de los insolubles en que las porciones anfifílicas (los cuales constituyen el mayor grupo de lípidos en las membranas biológicas) poseen solamente mayor carácter hidrofílico.²

Tabla I
CLASIFICACION DE LOS LIPIDOS DE ACUERDO A SU COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN ACUOSA.

Clase :	Comportamiento en superficie	Comportamiento en Masa	Ejemplos
Lipidos no polares	Sin monocapa	insoluble	Hidrocarburos, Esteres de Colesterol de Acidos Grasos.
Lipidos Polares I. Anfifilicos insolubles no buenos	Monocapa estable	Insoluble	Triacilglicolores, Diacilglicolores, Acidos Grasos de cadena larga, Colesterol.
II. Anfifilicos insolubles buenos	Monocapa estable	Liquidos puros Cristales	Fosfolipidos, Monoacilglicolores y Glicolpidos con menos de cuatro unidades carbonadas.
III. Anfifilicos Solubles A) Con mesomorfismo isotrópico	Monocapa inestable	Micelas arriba de CMC, cristales liquidos a altas concentraciones	Sales de Sodio Potasio de Acidos Grasos de cadena larga, muchos detergentes aniónicos, catiónicos y no ionicos, isolectina, gangliocidos.
B) Con mesomorfismo no isotrópico	Inestable	Micelas arriba de CMC	Sales Biliares, Saponinas y Clorpromacina.

CMC = Concentración Micelar Crítica
 Ref. 2

Cabe mencionar, que a lo largo del presente texto, se mencionan las palabras tensoactivo, anfífilos y/o molécula anfífilica, las cuales se utilizan indistintamente siendo su significado el mismo.

1.1 Clasificación de Agentes Tensoactivos

Los tensoactivos se clasifican en cuatro categorías principales: aniónicos, catiónicos, anfotéricos y no iónicos.

1.1.1 Aniónicos.

Se caracterizan por poseer un grupo polar capaz de ionizarse en solución acuosa, adquiriendo una carga eléctrica negativa. En este grupo se encuentran los jabones, los sulfonatos, y los sulfatos como componentes principales.

Jabones. Los tensoactivos aniónicos que contienen iones carboxilatos son los jabones, que se preparan generalmente por saponificación de glicéridos naturales de ácidos grasos en solución alcalina. Los cationes más comunes asociados a los jabones son: sodio, potasio, amonio, trietanolamina, y la cadena de los ácidos grasos tiene 12 a 18 carbonos de longitud.¹

El grado de hidrosolubilidad depende mucho de la cadena alquílica y de la presencia de dobles enlaces. Por ejemplo: el estearato de sodio es totalmente insoluble en agua, pero en las mismas condiciones el oleato de sodio es muy soluble en agua. Los iones multivalentes, como los de calcio y magnesio, producen marcada insolubilidad en agua, incluso a cadenas alquílicas menores, por eso los jabones no son útiles en agua dura, rica en estos iones. Los jabones que son sales de ácidos débiles están sujetos también a hidrólisis y a la formación de ácido más ion hidróxido, especialmente cuando están en solución más concentrada.¹ Desde el punto de vista farmacéutico tienen la desventaja de tener un sabor desagradable y presentar una acción irritante sobre el tracto gastrointestinal debida al pH de sus soluciones acuosas.

Sulfonatos. Son agentes tensoactivos con un grupo polar ionizable en solución acuosa, este grupo ionizable es el grupo sulfónico en el cual el átomo de azufre está unido a un átomo de carbono y puede representarse como su estructura general como : (segmento lipofílico) - CH₂ - SO₃⁻ Na⁺ .

Para compensar algunas desventajas de los jabones pueden usarse muchos sulfonatos de cadena alquílica larga y sulfonatos de alquilo arilo como el sulfonato de dodecílbenzeno sódico ; el ion sulfonato está menos sujeto a hidrólisis y precipitación en presencia de iones multivalentes. Un grupo popular de sulfonatos muy usados en sistemas farmacéuticos es el de los sulfosuccinatos de sodio dialquílicos, particularmente el sulfosuccinato de sodio bis-(2-etilhexil), llamado Aerosol OT. Este compuesto es único por ser soluble en agua y en aceite, por lo cual forma micelas en ambas fases. Reduce la tensión superficial y de interfase a valores muy bajos y actúa como excelente agente humectante en muchos tipos de formas farmacéuticas sólidas.¹

Sulfatos. En estos agentes tensoactivos el grupo polar hidrofílico ionizable en solución acuosa es el grupo sulfato. El más popular de este grupo es el laurilsulfato de sodio, muy usado como emulsionante y solubilizador en sistemas farmacéuticos. A diferencia de los sulfonatos, los sulfatos son susceptibles a hidrólisis con formación del alcohol de cadena larga, por lo cual el control de pH es muy importante para las soluciones de sulfatos.¹

1.1.2 Catiónicos.

Los agentes tensoactivos catiónicos se caracterizan por poseer un grupo polar hidrofílico capaz de ionizarse en solución acuosa adquiriendo una carga eléctrica positiva.

Muchos cationes de cadena larga, como los aminosales y las sales de amonio cuaternario, se usan a menudo como agentes tensoactivos disueltos en agua, pero su uso en preparaciones farmacéuticas se limita a la función de conservadores antimicrobianos y no a la de agentes tensoactivos, porque los cationes se adsorben muy fácilmente a

estructuras de membrana celular en forma inespecífica provocando lisis celular, lo mismo que los agentes aniónicos, éstos en menor grado. Así actúan destruyendo hongos y bacterias.¹

Como los agentes aniónicos y no iónicos no son tan efectivos como conservadores, debemos deducir que la carga positiva de estos compuestos es importante, pero se ha demostrado que el grado de actividad superficial determina la cantidad de material necesaria para una cantidad dada de preservación. Las sales de amonio cuaternario son preferibles a las sales de amina libres porque no dependen en absoluto del pH. La presencia de aniones orgánicos como colorantes y polielectrólitos naturales es una fuente importante de incompatibilidad, y esta combinación debe evitarse.¹

1.1.3 Anfotéricos.

El grupo principal de moléculas de esta categoría es el que contiene grupos carboxilato o fosfato como anión, y grupos amino o amonio cuaternario como catión. El primer grupo está representado en varios polipéptidos, proteínas y alquilo betaínas, y el segundo consiste en fosfolípidos como lecitinas y cefalinas. En general, los anfotéricos de cadena larga que existen en solución en forma zwitteriónica son más tensoactivos que los agentes iónicos con el mismo grupo hidrófobo, pues en realidad los iones de carga opuesta están neutralizados. Sin embargo, comparados con los no iónicos aparecen a la mitad de camino entre los iónicos y los no iónicos.¹

1.1.4 No iónicos.

Los agentes tensoactivos no iónicos son tal vez lo más utilizados en las formulaciones farmacéuticas debido a sus características de compatibilidad, estabilidad y en general baja toxicidad relativa a otros grupos de tensoactivos. Se clasifican relativamente en insolubles en agua y perfectamente solubles en agua.¹

El tipo principal de compuestos que forma este primer grupo es el de los ácidos grasos de cadena larga y sus derivados insolubles en agua. Estos incluyen : 1)alcoholes grasos como los lauril, cetil (16 carbonos), y estearil alcoholes ; 2) ésteres de glicerol,

como los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos naturales y 3) ésteres de ácidos grasos y otros alcoholes como propilenglicol, polietilenglicol, sorbitán, sacarosa y colesterol. También se incluyen en esta clase general de compuestos no iónicos insolubles en agua los alcoholes esteroides libres como el colesterol.¹

Para aumentar la hidrosolubilidad de estos compuestos y para formar el segundo grupo de agentes no iónicos, se añaden grupos polioxietileno mediante una unión de éter con uno de sus grupos alcohólicos. La lista de derivados conocidos es demasiado larga para mencionarla en su totalidad, pero daremos algunas categorías generales.¹

Los compuestos más usados son los ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, que se encuentran en formulaciones farmacéuticas de uso interno y externo. Los compuestos íntimamente relacionados incluyen polioxietilenglicérol y ésteres esteroides, así como los ésteres de polioxipropileno comparables. También es posible una unión directa de éter con el grupo hidrofóbico y con un éter de polioxietileno estearilo o fenol de polioxietileno alquilo. Estos éteres, a diferencia de los ésteres, son muy resistentes a la hidrólisis ácida o alcalina, y esto constituye una ventaja.¹

1.2 Toxicidad de Tensioactivos

La necesidad de investigar más sobre la toxicidad de tensioactivos, crece a medida que aumenta su uso en preparaciones farmacéuticas como agentes humectantes, solubilizantes y emulsionantes. Esta última consideración es más importante cuando se formulan emulsiones para administración intravenosa. Algunos de esos efectos tóxicos se deben a la interacción con proteínas específicas, a cambios en la actividad interfacial, a la interacción con membranas o dispersión llevadas por tensioactivos.

1.2.1 Toxicidad oral

La toxicidad de tensioactivos por vía oral, depende de la estructura molecular detallada, pero en general, se considera a los tensioactivos no iónicos como menos tóxicos que los tensioactivos iónicos. En general, los tensioactivos que tienen grupos

aromáticos, son más tóxicos que los tensoactivos enteramente alifáticos. Los tensoactivos de la serie Tween se han establecido inocuos para animales y humanos en la administración oral a largo plazo.³

Con respecto a la toxicidad crónica, estudios realizados durante un periodo de 2 años, en ratas, el cloruro de alquildimetilbencil amonio, fue el más tóxico. Entre los surfactantes aniónicos, la toxicidad crónica disminuye en orden de sulfonato de alquilareno, sulfosuccinato de dioctil de sodio, y sulfato de alquilo de sodio. La toxicidad involucra irritación en el tracto gastrointestinal.³

Sin embargo, la toxicidad oral de tensoactivos puede ser relacionada con los efectos de diferentes enzimas. El hecho de que los tensoactivos iónicos reaccionen fácilmente con proteínas, puede explicar el efecto enzimático inhibitorio de estos compuestos. Se sabe que las lipasas se activan por los ácidos biliares. Sin embargo, el lauril sulfato de sodio y los Tween, inhiben a estas enzimas. Por otro lado, se ha encontrado, que los ácidos biliares inhiben a las hidrolasas tales como la quimotripsina y la fosfatasa alcalina.³

1.2.2 Toxicidad por vía tópica

Los efectos de tensoactivos en la piel han alcanzado un gran interés, especialmente desde su introducción de detergentes sintéticos, los cuales frecuentemente producen dermatitis por contacto. Los síntomas pueden variar, desde una piel moderadamente escaldada y áspera, a serias ulceraciones. Estas pueden deberse a irritación primaria como a reacciones alérgicas con pronunciadas variaciones individuales. *Stupel* establece que la interacción entre tensoactivos y la piel, involucra la remoción de grasa de la piel, reacción con proteínas de la piel, hinchamiento de la epidermis, y la abolición de la reacción ácida de la piel. En general, los compuestos de cadena larga no ramificada, son menos irritantes que los de cadena corta y los de cadena ramificada. Los tensoactivos que poseen una cadena de 12 carbonos ejercen una irritación mayor, lo anterior se ha establecido por varios autores. Los sulfatos de monoalquilo y los alquilareno se han demostrado ser más irritantes que los jabones de

ácidos grasos. A pesar de las grandes variaciones, los tensoactivos no iónicos son generalmente suaves.³

1.2.3 Toxicidad por vía parenteral

Como en el caso de muchos compuestos, la toxicidad de los tensoactivos es mucho más elevada por vía parenteral que por vía oral. Sin embargo, no hay evidencia de que exista correlación entre la toxicidad oral y la parenteral de los tensoactivos. Entre una serie de sulfatos monoalquílicos homólogos, ha se encontrado que el dodecil sulfato es más tóxico cuando se administra intraperitonealmente, mientras que el decil sulfato es menos tóxico al administrarse oralmente.³

En administración parenteral, el efecto hemolítico del tensoactivo es una señal de toxicidad. *Shulman, Rideal* y sus colaboradores han desarrollado algunas teorías acerca de la acción hemolítica de tensoactivos iónicos. Ellos sugieren una interacción entre el tensoactivo y el colesterol contenido en las lipoproteínas de la membrana del eritrocito. Respecto a los tensoactivos no iónicos como el Triton WR-1352 y el Triton A-20, son prácticamente no hemolíticos. Estudios revelan que la toxicidad de tensoactivos no iónicos disminuye en el orden decreciente de éteres de alquil polioxietileno > éteres de alquilfenol polioxietileno > éteres polioxietileno de ácidos grasos > Tween.³

En los Tween el efecto hemolítico disminuye con el incremento de la longitud del residuo de ácido graso y se encontró que el más débil era el monooleato (Tween 80). Es decir el Tween 80 tiene un mayor tamaño que el Tween 20 y de esta manera es menos tóxico. Se ha reportado también que soluciones inyectadas subcutáneamente e intravenosamente de éteres de polioxietileno de alquilo, no producen un enturbiamiento en la sangre. Cuando se inyectó intravenosamente, pequeñas dosis de Tween a perros, se produjo una caída en la presión sanguínea. Es importante señalar que en general, los estudios "in vitro" no toman en cuenta el efecto de dilución del tensoactivo al incorporarse al torrente sanguíneo; y que esto limita la correlación in vitro in vitro. Esto se demostró debido a la liberación de histamina inducida por los Tween. La

toxicidad en pulmón por tensoactivos, administrados en aerosol, también se ha estudiado. *Hall* encontró que diferentes tensoactivos aniónicos en concentraciones de 0.1 % fueron aparentemente no tóxicos a puercos de guinea, mientras que altas concentraciones causaron disnea y cambios característicos histológicos en los pulmones.³ Sin embargo aún se desconocen los mecanismos específicos mediante los cuales, los tensoactivos no iónicos, causan toxicidad.

1.3 Uso de tensoactivos en productos farmacéuticos

Como anteriormente se mencionó, los tensoactivos son ampliamente usados en muchas preparaciones farmacéuticas como solubilizantes, emulsificantes o dispersantes.³ Ingredientes mutuamente incompatibles, por la acción de tensoactivos pueden ser frecuentemente usados juntos en emulsiones o lociones, cuando estos no se pueden combinar satisfactoriamente de otro modo.⁴

Algunos esteroides, como la progesterona o cortisona y gran variedad de fármacos como la benzocaína, cloranfenicol y la sulfanilamina se solubilizan o dispersan en polioxietileno monoleato de sorbitán, o polisorbato 80 USP (Tween 80). El yoduro puede ser solubilizado para aplicación tópica por el Tween 20 o Tween 80. Vitaminas liposolubles, A y D se solubilizan en soluciones acuosas de polisorbato 80. Ambas vitaminas liposolubles y aquellas solubles en agua, como la tiamina y la nicotinamina se incorporan en la misma fórmula por el uso del polisorbato 80.⁴

La actividad biológica se ve incrementada en ciertos casos con fármacos administrados en forma solubilizada. En adultos con esteatorrea, el grado de absorción intestinal de grasa y la velocidad de absorción de Vitamina A se incrementa por la adición de Tween 80 a la dieta. Efectos similares por Tween 80 en absorción de vitamina A y grasa se ha encontrado en infantes prematuros.⁴

En tabletas con cubierta de capa fina que contienen cera de polietilenglicol y ftalato acetato de celulosa se ha utilizado monoleato de sorbitán como plastificante.³

La vacuna para la influenza, emulsificada en aceite mineral usando monoleato manide (ARLACEL A) para formar una emulsión W/O* mantiene un título de anticuerpos más alto que el encontrado en una preparación acuosa. Extractos similares emulsificados para el tratamiento de alergias también se preparan con ARLACEL A con el objeto de minimizar la frecuencia de inyecciones requeridas.⁴

Emulsiones oleosas para inyección intravenosa se han estabilizado por Tween 60 o por la combinación de monoestearato de glicerol con Tween 60.⁴

La suspensión de fármacos insolubles en fluidos acuosos, frecuentemente es asistida por tensoactivos de poliol, cada uno solo o en combinación con otros. La Penicilina G procainica es dispersada por el polisorbato 80 o por una mezcla de monopalmitato de sorbitan y monopalmitato polioxietileno de sorbitán.⁴

Una variedad de tensoactivos son usados como base para supositorios incluyendo al monoestearato de propilenglicol, laurato de glicerol, ésteres de sorbitán y combinaciones de estos. Los supositorios diseñados con estos tensoactivos son formulados por tener un amplio rango de puntos de fusión, consistencias y solubilidades, así como alta velocidad de liberación de los medicamentos administrados.⁴

1.4 Propiedades fisicoquímicas generales de tensoactivos no iónicos

1.4.1. Generales. Excelentes detergentes; pobres propiedades espumantes (esto no significa que no puedan crear y/o estabilizar espuma en presencia de otros tensoactivos); pobres humectantes, buenos emulsificantes, no se adsorben en superficies cargadas.⁵

1.4.2 Humectación. La adición de electrolitos generalmente reduce el poder humectante.⁵

1.4.3. Espumantes. Como regla, los tensoactivos no iónicos se encuentran de

*Agua/Aceite

moderados a bajos espumantes, pero el contenido de óxido de etileno óptimo a su temperatura óptima, se acercan a ser tan buenos como los sulfonatos de alquil benceno lineales (LABS).⁵

Los tensoactivos no iónicos pueden ser desespumantes cuando están prácticamente insolubles en un sistema, pero son frecuentemente más usados como estabilizadores para espuma para tensoactivos aniónicos, por ejemplo, las alcanoaminas.⁵

1.4.4 Solubilización. Es la disolución de una sustancia en una solución acuosa de un tensoactivo para formar una solución clara y homogénea.⁵

La solubilización toma lugar en las micelas dado que los tensoactivos no iónicos forman micelas a concentraciones apreciablemente más bajas que los tensoactivos aniónicos y catiónicos, podría esperarse que los no iónicos podrían por eso cosolubilizar compuestos orgánicos a más bajas concentraciones que las especies cargadas. En suma, el gran tamaño de la micelas de los tensoactivos no iónicos junto con las propiedades solubilizantes del anillo de polioxietilén glicol, también como hidrofóbicos, podría sugerir que los tensoactivos no iónicos, puedan ser usados para solubilizar compuestos orgánicos de diferentes solubilidades, en solución acuosa.⁵

1.4.5 Emulsificación. Los tensoactivos no iónicos han sido ampliamente usados como agentes emulsificantes. En la práctica, las emulsiones más estables se hacen con dos o más tensoactivos de diferentes propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas.⁵

1.4.6 Propiedades dispersantes. Los tensoactivos no iónicos ayudan a dispersar partículas orgánicas e inorgánicas en sistemas acuosos y no acuosos. Ellos ayudan a humedecerlas, reduciendo el trabajo para dispersarlas, previniendo la agregación de las partículas y reduciendo la floculación y la fijación. Los compuestos poliméricos solubles en agua (por ejemplo, el polivinil alcohol) se usan para este propósito y la cadena de polioxietileno se comporta de manera similar en los tensoactivos no iónicos.⁵

1.4.7 Detergencia. Existen un gran número de datos acerca de la longitud de la cadena de carbonos óptima y el contenido de óxidos de etileno de tensoactivos no

iónicos usados como detergentes, muchos de los cuales son contradictorios. El principal problema es el método de prueba y los demás componentes en el detergente. El tipo de mancha tiene también un gran efecto en la eficiencia del detergente y los tensoactivos no iónicos, son en general, más eficientes en remover suciedad orgánica que inorgánica o polar. El efecto de la concentración es importante con óptimos de concentración de 0.1% o más grande (particularmente si los tensoactivos no iónicos están por debajo del punto nube). La temperatura es importante para un máximo de detergencia óptimo a o cerca del punto nube.⁵

En la práctica, los tensoactivos no iónicos son usados en mezclas con tensoactivos aniónicos para uso pesado, con los aniónicos en mayor proporción. Recientemente se ha incrementado la cantidad de los no iónicos relativamente a los aniónicos por temperatura de lavado más baja y poder detergente. En detergentes acuosos, los tensoactivos no iónicos son usados a concentraciones más altas.⁵

1.5 Pureza de Tensoactivos

El número de tensoactivos diferentes es grande y cientos de ellos se han utilizado ampliamente en estudios con enfoque bioquímico. Los tensoactivos comerciales son casi siempre impuros. Pueden contener cantidades variadas de agua y aditivos. Un lote puede diferir del siguiente, y después de un prolongado almacenamiento, el contenido del fondo del recipiente puede diferir del de la superficie, como suele suceder en los tensoactivos líquidos no iónicos.²

Para obtener resultados reproducibles en estudios de laboratorio, es conveniente purificar los tensoactivos cuando esto sea posible. En el caso de tensoactivos no iónicos, los cuales son difíciles de purificar, el grado de pureza del tensoactivo utilizado puede ser determinante. Las sales biliares y otros tensoactivos iónicos se pueden purificar por cristalización.²

Los tensoactivos no iónicos, por ejemplo pueden contener cantidades apreciables de fósforo contaminante que interfiere en determinaciones de fosfolípidos.²

Otro problema es la heterogeneidad en los tensoactivos no iónicos, dado que una gran mayoría son productos de polimerización. A menos que se fraccionen, estos tienen grupos de cabezas de polioxietileno polidispersos debido a la polimerización estática del óxido de etileno. El número de unidades de polioxietileno por molécula dada por el fabricante es así, un valor medio. También hay heterogeneidad en la porción hidrofóbica de tensoactivos sintéticos desde que se han usado algunos ácidos grasos no homogéneos y alcoholes para su síntesis.²

1.6 Balance Hidrofilico-Lipofílico (HLB)

Con el incremento de tensoactivos, especialmente no iónicos, utilizados en la formulación de emulsiones (que es uno de los principales propiedades de los agentes tensoactivos); debe considerarse que el material elegido no sea tóxico, y que su olor, sabor y estabilidad sean compatibles con el producto. Para obtener una medida para el balance del tamaño y fuerza de oposición de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en tensoactivos no iónicos, *Griffin* introdujo un valor empírico arbitrario, llamado Balance Hidrofilico-Lipofílico (HLB).¹

Existen métodos para calcular el valor HLB de un nuevo agente tensoactivo. *Griffin* dedujo ecuaciones simples que pueden usarse para obtener una estimación con ciertos compuestos. Se ha demostrado que la capacidad de un compuesto de extenderse sobre una superficie tiene relación con su HLB. El Valor HLB ayuda a predecir la utilidad de tensoactivos para aplicaciones particulares. Los materiales más hidrofóbicos tienen un valor HLB bajo (1-10). La tabla II muestra los valores de algunos tensoactivos no iónicos. Un incremento en el valor HLB corresponde a un carácter hidrofílico.¹

Diversos investigadores han intentado correlacionar el HLB de un tensoactivo con su toxicidad, sin embargo, esto no ha sido exitoso.

1.7 Concentración Micelar Crítica (CMC)

Cuando pequeñas cantidades de tensoactivo soluble se adicionan al agua, parte de él se disuelve como monómero y parte forma una monocapa en la interfase agua/aire. Las moléculas en la monocapa están en equilibrio con los monómeros en el volumen de la solución. Cuando la concentración monomérica alcanza un valor crítico, al adicionar más tensoactivo se comienzan a formar micelas. Las micelas se definen como agregados coloidales termodinámicamente estables, formados espontáneamente por tensoactivos por encima de un estrecho rango de concentración (la concentración micelar crítica CMC) y a temperaturas por arriba de la temperatura micelar crítica.²

Tabla II

Valores HLB y CMC de algunos tensoactivos no iónicos

Tensoactivo	Nombre Comercial	HLB	CMC (mM)
Monolaurato de sorbitán	Span 20	9	
PEG (10) estearil alcohol	Brij 76	12.4	0.03
PEG (10) oleil alcohol	Brij 96	12.4	<0.04
PEG (10) cetil alcohol	Brij 56	12.9	0.002
PEG (9-10) p-t-octil fenol	Tritón X-100	13.5	0.240
PEG (20) monoestearato de sorbitol	Tween 60	14.9	-
PEG (20) monooleato de sorbitán	Tween 80	15.0	-
PEG (29) oleil alcohol	Brij 98	15.3	0.025
PEG (20) monopalmitato de sorbitol	Tween 40	15.6	-
PEG (20) cetil alcohol	Brij 58	15.7	0.077
PEG (20) monolaurato de sorbitán	Tween 20	16.7	0.810

PEG, Polioxietilén glicol.

Los datos de HLB y los valores de CMC fueron tomados de la ref. 2

El punto Krafft es la temperatura a la cual ocurre el aclaramiento en la solución donde la concentración del tensoactivo está en su CMC. Para muchos tensoactivos, la temperatura micelar crítica y el punto Krafft son sinónimos pero la distinción es útil, porque hay casos, por ejemplo en los litocolatos, donde la temperatura micelar crítica es dependiente de la concentración.²

La fuerza que conduce a la agregación espontánea de las moléculas tensoactivas para formar micelas es hidrofóbica. El interior de las micelas consiste de grupos hidrofóbicos. En ellos, los grupos hidrofóbicos son secuestrados del agua (en el caso donde el disolvente es agua), por los grupos polares, los cuales cubren la superficie de la micela. Cuando los grupos hidrofóbicos son cadenas hidrocarbonadas, el interior micelar está en un estado como líquido aproximado al hidrocarburo líquido. Termodinámicamente la formación de micelas puede por eso tratarse como un fenómeno de separación de fases.²

Al igual que con el HLB, no se ha encontrado una relación toxicidad-CMC.

El interés en encontrar una correlación es la siguiente : si se establece una relación entre parámetros fisicoquímicos (como HLB y CMC) y la toxicidad, entonces sería más fácil para los farmacéuticos ; tanto la síntesis de nuevos tensoactivos menos tóxicos, así como su aplicación en nuevas formulaciones farmacéuticas.

1.8 Estructura de las membranas biológicas

Las membranas biológicas constituyen mezclas complejas de lípidos, proteínas, iones, etc. Su función es indispensable para la vida. Las membranas plasmáticas confieren a las células su individualidad al separarlas de su entorno. Constituyen barreras de permeabilidad muy selectivas, ya que contienen sistemas de transporte, como bombas y compuertas muy selectivas, que regulan la composición iónica y molecular del medio intracelular. Además controlan el flujo de información entre las células y su medio ambiente. Constituyen receptores específicos para los estímulos

externos. Algunas membranas generan señales, como la transmisión de impulsos nerviosos.⁶

1.8.1 Características de las membranas

1. Las membranas son estructuras laminares, con un grosor aproximado de 6 y 10 nm.

2. Las membranas constan principalmente de lípidos y proteínas. Contienen en menor proporción hidratos de carbono que se enlazan a los lípidos y a las proteínas.

3. Los lípidos de las membranas son moléculas relativamente pequeñas y en medios acuosos forman láminas bimoleculares cerradas, que constituyen obstáculos al flujo de moléculas polares.

4. Algunas proteínas se comportan como bombas, compuertas, receptores transductores de energía y enzimas. Estas se encuentran intercaladas en las bicapas lipídicas.

5. Las membranas constituyen asociaciones no covalentes. Los lípidos y proteínas de las membranas se mantienen unidas por un carácter cooperativo.

6. Las membranas son asimétricas. Los lípidos pueden estar distribuidos asimétricamente entre las dos hojas de la bicapa de la membrana.

7. Las membranas son estructuras fluidas. Diferentes regiones de las bicapas pueden estar en estado físico (rígida o fluida), con diferente composición en lípidos

8. La mayoría de las membranas están polarizadas eléctricamente, con una carga negativa en su interior.

1.8.2 Lípidos de membrana

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan solubilidad elevada en disolventes orgánicos. Sirven como moléculas combustibles, como almacenes de energía altamente concentrada y fundamentalmente como componentes de las membranas.⁶

Los tres tipos principales de lípidos de membrana lo constituyen los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol.

Fosfolípidos. Son derivados del glicerol o de la esfingosina. Las cadenas de ácidos grasos en los fosfolípidos y glicolípidos contienen un número par de átomos de carbono, generalmente entre 14 y 24. En los animales, la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos no está ramificada. Estos ácidos pueden ser saturados o insaturados. La longitud de la cadena y el grado de insaturación de los ácidos grasos tienen un profundo efecto en la fluidez de la membrana. La esfingomielina es el único fosfolípido que no deriva del glicerol.⁶

Glicolípidos. Son como su nombre lo indica, lípidos que contienen azúcares. En las células animales, los glicolípidos al igual que la esfingomielina, derivan de la esfingosina. Los glicolípidos difieren de la esfingomielina en la naturaleza de la unidad que enlaza al grupo hidroxilo primario del esqueleto de la esfingosina. En los glicolípidos, uno o más azúcares van unidos a este grupo. El glicolípidos más sencillo es el cerebrósido en el que hay solamente un residuo de azúcar, glucosa y galactosa. Los glicolípidos más complejos son los gangliósidos, que contienen una cadena ramificada de hasta siete monosacáridos.⁶

Colesterol. Se encuentra en diferente proporción en las membranas. Es de origen esteroideal. Las células eucarióticas generalmente son ricas en colesterol.⁶

Los lípidos de las membranas son moléculas anfipáticas ya que contienen a la vez partes hidrofílicas e hidrofóbicas. Su unidad hidrofílica, también se denomina grupo o cabeza polar, mientras que sus cadenas hidrocarbonadas se denominan colas.⁶

La estructura más favorable para la mayoría de los fosfolípidos y glicolípidos en medios acuosos es la bicapa lipídica en vez de la micela. La preferencia por una estructura de bicapa en lugar de una micelar es de importancia biológica fundamental. Los fosfolípidos y glicolípidos son constituyentes clave de las membranas porque forman capas bimoleculares extensas.⁶

La formación de bicapas lipídicas es un proceso de autoensamblaje. La estructura de la bicapa, se puede decir que es consecuencia de su carácter anfipático. Las interacciones hidrofóbicas son las principales fuerzas que determinan la formación de la bicapa. Existen además, fuerzas de Van der Waals entre las colas hidrocarbonadas. Finalmente, también se producen interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno, entre los grupos polares de la cabeza y las moléculas del agua.⁶

Estos factores energéticos tienen tres consecuencias biológicas significativas : 1) las bicapas lipídicas tienen una tendencia espontánea a ser extensas ; 2) las bicapas lipídicas tenderán a cerrarse en sí mismas, de tal manera de que no existan extremos con cadenas hidrocarbonadas expuestas, lo que da por resultado un empaquetamiento y 3) las bicapas lipídicas se autorreparan puesto que un orificio en la bicapa es desfavorable.⁶

Los lípidos de la membrana y muchas proteínas están en movimiento lateral de forma constante. La rotación espontánea de los lípidos de un lado a otro de la membrana es un proceso muy lento, a diferencia de su movimiento paralelo al plano de la bicapa. La transición de una molécula desde una superficie de la membrana a la otra se denomina difusión transversal, o flip-flop, mientras que en el plano de la membrana se llama difusión lateral. Las barreras de energía libre que se oponen al flip-flop de las moléculas proteicas son aún mayores que en el caso de los lípidos porque las proteínas tienen regiones polares más extensas. De hecho, nunca se ha observado difusión transversal de una molécula proteica. Debido a esto, la asimetría de la membrana puede mantenerse durante largos periodos de tiempo.⁶

La superficies externa e interna de todas las membranas biológicas conocidas tienen diferentes componentes y diferentes actividades enzimáticas.⁶

La asimetría absoluta de la membrana se mantiene por la carencia de movimiento transmembranar de las proteínas de la membrana (que están orientadas porque se sintetizan y se insertan de manera asimétrica), durante la vida de la membrana y porque éstas se sintetizan por crecimiento de las ya existentes. También

los lípidos se distribuyen de esta manera como resultado de su propia biosíntesis, pero normalmente esta asimetría no es absoluta, excepto en el caso de los glicolípidos. En el eritrocito, las esfingomielinas y las fosfatidilcolinas se sitúan con preferencia en la hoja externa de la bicapa, mientras que las fosfatidiletanolaminas y las fosfatidilserinas se sitúan en la hoja interna. En ambas hojas hay gran concentración de colesterol.⁶

1.8.3 Fluidez de la Membrana

El estado rígido de la membrana biológica está favorecido por la presencia de residuos de ácidos grasos saturados porque sus cadenas hidrocarbonadas rectas interaccionan muy favorablemente unas con otras.⁶

Las cadenas de ácido graso de los lípidos puede encontrarse en las bicapas, en forma ordenada y rígida o bien en forma relativamente desordenada, en estado fluido.⁶

Los procariontas regulan la fluidez de la membrana variando en número de dobles enlaces y la longitud de las cadenas de sus ácidos grasos.⁶

En los eucariotas, el colesterol es el principal regulador de la fluidez de la membrana. El colesterol consta de un voluminoso núcleo esteroideo con un grupo hidroxilo en un extremo y una cadena hidrocarbonada flexible en el otro. El colesterol se inserta en la membrana con su eje longitudinal perpendicular al plano de la membrana. El grupo hidroxilo del colesterol está unido por un puente de hidrógeno a un átomo de oxígeno del carbonilo de la cabeza del fosfolípido, mientras que la cadena hidrocarbonada del colesterol se coloca entre las cadenas apolares. Por esto, el colesterol modula la fluidez de la membrana.⁶

1.9 Modelo de Mosaico Fluido

El modelo de mosaico fluido propuesto por *Jonathan Singer* y *Garth Nicolson*, en 1972 para explicar la organización fundamental de las membranas biológicas,

establece que las membranas son disoluciones bidimensionales de proteínas globulares y lípidos orientados.⁶

Esta teoría se fundamenta principalmente en observaciones experimentales y sus aspectos son los siguientes :

1) La mayoría de las moléculas de fosfolípidos y glicolípidos de membrana se distribuyen en forma de bicapa, que tiene un doble papel ; es a la vez un disolvente para las proteínas integrales de la membrana y también una barrera de permeabilidad.⁶

2) Una pequeña porción de los lípidos de la membrana interacciona específicamente con determinadas proteínas de las mismas y pueden ser esenciales para la función de éstas.⁶

3) las proteínas de la membrana pueden difundir lateralmente en la matriz lipídica a menos que queden restringidas por interacciones especiales, mientras que no son libres para girar de un lado a otro de la membrana.⁶

1.10 Eritrocitos como Modelo de Membrana

Los eritrocitos son probablemente el modelo de membrana más utilizado en estudios de toxicidad para tensoactivos. A continuación se enumeran algunas de las ventajas que posee y que lo hace el modelo preferido para llevar a cabo como anteriormente se mencionó, dichos estudios de toxicidad de tensoactivos.

1.- Composición. Posee fosfolípidos y glicolípidos dispuestos en forma de bicapa, al igual que casi todas las membranas biológicas.

2.- Fácil de obtener. Los eritrocitos se obtienen casi siempre de sangre venosa. Estos pueden proceder de animales de laboratorio, pero su composición difiere de los eritrocitos humanos, por lo que recientemente se ha venido utilizando estos últimos para permitir una correlación más certera con el hombre.

3.- Fácil de manipular. El eritrocito se puede manejar fácilmente, ya que no requiere de condiciones demasiado delicadas para trabajar en el laboratorio, a diferencia de algunos otros modelos como son los cultivos celulares, que necesitan condiciones estériles, y que suelen contaminarse fácilmente, además de presentar un costo elevado.

4.- Bajo costo. Se puede conseguir la sangre relativamente a un bajo costo de un Banco de Sangre o, cuando no es necesario grandes cantidades se puede obtener de donadores voluntarios.

5.- No utiliza animales. Obtener un modelo de membrana procedente de animales de laboratorio, significa requerimientos legales y un incremento en el costo de dicho modelo. Un modelo de membrana como el eritrocito humano facilita todos los requerimientos legales que se solicitan para trabajar con animales.

1.11 Alteraciones en la membrana inducidos por tensoactivos

Los compuestos anfifílicos que se intercalan en la bicapa lipídica de la membrana celular, afectan a la membrana en diferentes eventos, tales como en el transporte de iones, dispersando la célula y por endocitosis, a concentraciones sublétricas. En los eritrocitos, los anfifílicos actúan en un sentido bifásico, ya que a bajas concentraciones protegen a los eritrocitos contra hemólisis hipotónica, mientras que a concentraciones ligeramente más altas, ellos inducen hemólisis. El efecto de perturbación de la membrana es una consecuencia intrínseca del carácter del tensoactivo, y no se sabe todavía si las cabezas cargadas del tensoactivo o el tamaño de sus porciones hidrofóbicas, sea lo que marque o influencie la naturaleza de la perturbación. Así mismo, se desconoce si existe relación alguna entre la toxicidad, la CMC y el HLB.⁷

A bajas concentraciones no causan hemólisis y conforme se aumenta la concentración, en su rango estrecho de concentraciones, causa hemólisis a un 100 % dando una curva sigmoideal característica (Figura 1).⁷

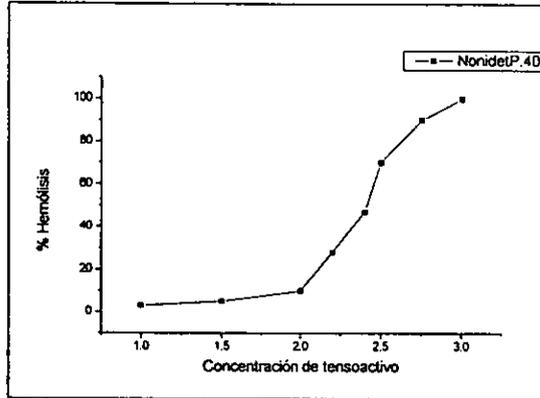


Figura 1. Hemólisis inducida por tensoactivo no iónico en eritrocitos humanos.

1.11.1 Efecto de tensoactivos en el transporte de iones en eritrocitos.

Ni la longitud de la cadena alquílica o la naturaleza del grupo polar de la cabeza parecen ser de crucial importancia en aumentar el efecto de algunos tensoactivos en el flujo pasivo de potasio a concentraciones por abajo de la hemólisis. El incremento en la permeabilidad de potasio inducida por tensoactivos es debido a interacciones no específicas de los anfifílicos sobre las membranas. Parece ser que cuando los anfifílicos se intercalan en la bicapa lipídica de la membrana, estos disminuyen el orden de empaquetamiento de la cadena hidrocarbonada de los lípidos en la bicapa; incrementando de este modo la permeabilidad de la bicapa al potasio y posiblemente también a otros iones.⁷

Se sugiere que tales efectos son inducidos vía alteración en el estado de transporte de proteínas. En los eritrocitos, los iones fosfato son transportados por una proteína integral de membrana, la cual es la principal proteína intercambiadora de aniones. El flujo de potasio es mediado por la ATP_{332} ($Na^+ \cdot K^+$). Estas dos proteínas son sensibles a alteraciones en la dinámica de la membrana. Los anfifílicos pueden alterar

la conformación de las proteínas transportadoras de iones y su capacidad transportadora.⁷

1.11.2 Alteraciones morfológicas de los eritrocitos inducidos por tensoactivos

Para explicar las alteraciones morfológicas de los eritrocitos inducidos por compuestos anfifílicos *Sheetz & Singer*⁸ formularon en 1974 una hipótesis llamada "Unión a la Bicapa", donde se explica la alteración en la forma del eritrocito como proveniente de una expansión diferencial de las dos monocapas de la bicapa lipídica. Los equinocitos provienen de una expansión mayor de la monocapa exterior relativa a la monocapa interior. Esto se da, según *Sheetz*, ya que ciertas moléculas anfifílicas tienden a incorporarse a la bicapa externa, aumentando así su tamaño. Los estomatocitos surgen de la expansión de la monocapa exterior en relación a la monocapa interior. Los anfifílicos aniónicos son equinocitogénicos y los catiónicos son estomatocigénicos. Lo anterior se ha establecido dado que los anfifílicos aniónicos se intercalan principalmente en la monocapa exterior y los catiónicos en la monocapa interior.⁷

De acuerdo a estudios realizados, las alteraciones en la forma inducidos por anfifílicos parece ser la consecuencia de rearreglos inducidos por ellos y no simplemente al intercalamiento selectivo de anfifílicos diferentemente cargados en cada uno de las dos monocapas, como lo sugiere la hipótesis de la Unión a la Bicapa.⁷

1.12 Proceso Hemolítico

Cuando las proteínas y otras macromoléculas comienzan pasar a través de la membrana, ocurre la lisis de la célula. La lisis por tensoactivos se ha estudiado en eritrocitos, ya que el proceso puede ser medido cuantitativamente por la liberación de la hemoglobina.

El proceso lítico puede ser dividido en cinco estados según *Reman*⁹ :

1.- Los monómeros de tensoactivo son adsorbidos a la superficie de la membrana.

2.- Penetran en la membrana, donde

3.- Inducen un cambio en la organización molecular, esto lleva a

4.- Una alteración en la permeabilidad en el equilibrio osmótico, y finalmente

5.- A la liberación de la hemoglobina.

Los estados 2, 3 y 4 están limitados por la velocidad de adsorción del tensoactivo. La lisis resulta de una interacción del tensoactivo y los lípidos de la membrana. Se ha sugerido que los tensoactivos pueden actuar como punto de entrada los cuales destruyen la orientación natural de la bicapa lipídica.⁸

1.13 Actividad hemolítica intrínseca

Muchos fármacos, además de los tensoactivos hemolizan a los eritrocitos en dos pasos principalmente :

1) La unión del fármaco a la membrana y

2) La perturbación de la membrana,

por el resultado en un cambio en la permeabilidad, llevando a una ruptura osmótica de la célula.

Para producir hemólisis es necesaria la afinidad del fármaco a la membrana y la actividad perturbadora en la membrana o "actividad hemolítica intrínseca". Esta última se puede expresar como el inverso de la concentración del fármaco en la intramembrana, requerida para causar hemólisis.

El grado de hemólisis depende de la cantidad de tensoactivo unido al eritrocito.

La resistencia que soporte la membrana a ser lisada, también depende de la edad de la propia célula, así se puede obtener una actividad hemolítica intrínseca característica para cada tensoactivo y los eritrocitos utilizados.

II . Desarrollo Experimental

1. Reactivos

Solución Reguladora de Fosfatos (pH=7.4)

Reactivo de Drabkins

Agua destilada

2. Preparación de Soluciones

2.1 Solución Reguladora de Fosfatos (pH=7.4)(PBS)

NaCl 10 g/L

KCl 0.25 g/L

Na₂HPO₄ 1.44 g/L

KH₂PO₄ 0.25 g/L

Agua destilada para 1 litro de solución.

2.2 Reactivo de Drabkins

Bicarbonato de sodio (100 partes)

Ferricianuro de potasio (20 partes)

Cianuro de potasio (5 partes)

2.3 Soluciones Tensoactivas

Los agentes tensoactivos se disuelven en PBS a una concentración dada en %p/p. Se calienta el tensoactivo hasta unos 70°C, 5 minutos, y después se enfría a temperatura ambiente con agitación magnética.

2.4 Concentración Celular

La concentración eritrocítica se obtiene a partir de sangre humana, en tubos con anticoagulante EDTA.

La sangre se centrifuga a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. El plasma se remueve y se desecha . Posteriormente se hacen 3 lavados con solución reguladora de fosfatos con 5 partes de su volumen, cada vez removiendo el sobrenadante.

2.5 Cuenta Celular

La cuenta celular se lleva a cabo utilizando 0.02 ml de sangre venosa humana diluida en 30 ml de PBS. Se agita y se llena el Hematocitómetro con 0.02 ml. Se deja que el líquido penetre lentamente entre la cuadrícula y el cubrehematímetro por capilaridad, sin que se formen burbujas, y sin sobrepasar los canales de la cámara. Se deja reposar de 3-5 minutos, y se lee con objetivo de 40 x al microscopio. Se comienza a contar en la cámara 1 del Hematocitómetro, todas las células en el cuadrante central de 1 mm y en los cuatro cuadrantes de las esquinas de 1 mm. (Ver diagrama 1, Anexo J).

3. Equipo Utilizado

Centrífuga

Ultracentrífuga Sigma 2-15

Espectrofotómetro Spectronic 21 D-A Milton Roy

Incubadora con agitación automática

4. Método Analítico

Se colocan 300 μ L de la solución tensoactiva en tubos Eppendorf con 300 μ L de Suspensión celular de la concentración deseada a una temperatura de 37°C. Los tubos se incuban en un baño de agua durante 30 minutos a la temperatura anteriormente mencionada. Después de transcurrido el tiempo, se sacan del baño y se centrifugan a 3600 r.p.m. durante 2 minutos.

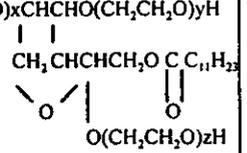
Se toman 300 μ L del sobrenadante y se transfieren a tubos de 13 x 100 con 2 ml de solución de reactivo de Drabkins. Se agitan y se dejan reposar durante 10 minutos.

Se lee en el espectrofotómetro a 540 nm, utilizando reactivo de Drabkins como blanco.

Se utilizan controles positivo (100 % de hemólisis) y negativo (0 % de hemólisis) para cada concentración de concentración celular.

5. Tensoactivos utilizados en el estudio

Los tensoactivos utilizados fueron :

Tensoactivo	Nombre Químico	Fórmula	Nombre Comercial
Tween 20**	Polioxietilen monolaurato de sorbitán (20)	$H(CH_2CH_2O)_xCHCHO(CH_2CH_2O)_yH$  $x+y+z=20$	Tween 20
C ₁₆ E ₁₀ *	Polioxietileno 10 hexadecil éter	C ₁₆ H ₃₄ (OCH ₂ CH ₂) ₁₀ OH	Brij 56
C ₈ Glucósido*	n-octil β-D-glucopiranosido	C ₁₄ H ₂₈ O ₆	-
C ₁₈ E ₂₀ *	Polioxietileno 20 estearil éter	C ₁₈ H ₃₇ (OCH ₂ CH ₂) ₂₀ OH	Brij 78
C ₁₂ Z*	Sulfonato 3(dimetil dodecilamonio) propano	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₂ (O)	-

**Tensoactivos adquiridos en Sigma

*Tensoactivos adquiridos en Fluka Biochemika

Tensoactivo	HLB	Peso Molecular
Tween 20	16.70	1010.0
C ₁₆ E ₁₀	12.90	682.0
C ₈ Glucósido	12.24	292.0
C ₁₈ E ₂₀	15.30	1151.5
C ₁₂ Z	5.20	335.5

* ref. Merk Index

III. Resultados y Análisis de Resultados

Cada experimento consistió en determinar el porcentaje de hemólisis producido por cada tensoactivo en el estudio a diferentes concentraciones y a distintas concentraciones celulares.

La figura 1 muestra las curvas dosis respuesta inducida por los tensoactivos no iónicos utilizados a la menor concentración celular experimentada de 1.6×10^8 cel/ml.

Como puede observarse, los tensoactivos $C_{16}E_{10}$ y $C_{18}E_{20}$ requieren concentraciones menores a 0.1 % p/p de tensoactivo para producir un efecto hemolítico del 100%, a diferencia del tensoactivo Tween 20 que requiere concentraciones mayores a 0.5 % p/p. Lo que sugiere un orden decreciente de toxicidad de $C_{16}E_{10} > C_{18}E_{20} > C_{12}Z > C_8$ Gluco > Tween 20.

Se ha observado que conforme se incrementa la concentración celular el porcentaje de hemólisis disminuye, lo anterior indica que se produce una menor interacción entre el tensoactivo y la membrana de las células, debido a que a medida que las células se encuentran en mayor concentración celular existe una mayor repartición de las moléculas de tensoactivo en una cantidad mayor de células, lo que impide la total ruptura de las membranas (Figura 2).

Para evaluar la afinidad del tensoactivo a la membrana del eritrocito es necesario saber que cantidad de tensoactivo se encuentra adsorbido a la membrana y que cantidad no se adsorbe. De acuerdo a la ecuación 1, originalmente propuesta por *Thron*¹⁰, se puede calcular la cantidad de tensoactivo adsorbido a la membrana del eritrocito como a continuación se muestra :

$$C_x = a_x N + b_x \quad \text{ec. 1}$$

donde C_x es la concentración de tensoactivo requerida para producir un x % de hemólisis, a_x es la cantidad de tensoactivo adsorbido a la membrana y b_x es la concentración de tensoactivo libre en el medio. N es la concentración celular.

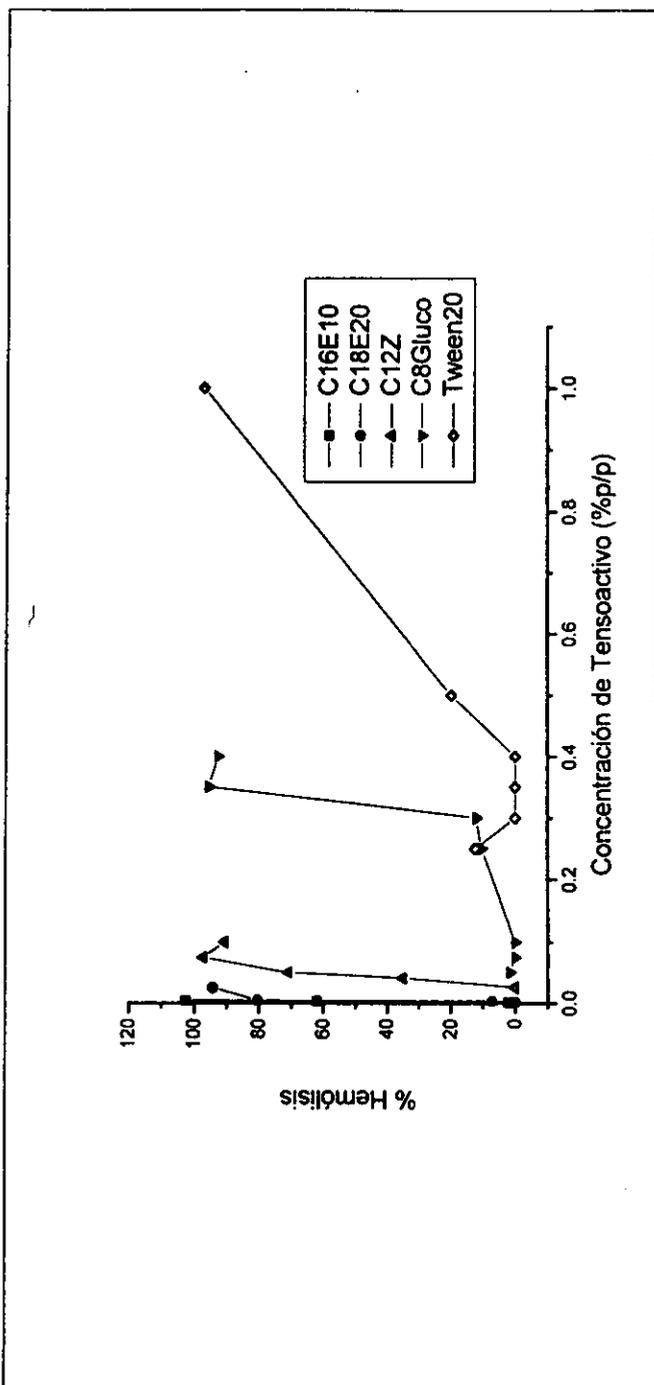


Figura 1. Hemólisis producida por diferentes tensioactivos no iónicos, a una concentración celular de 1.6×10^6 cel/ml

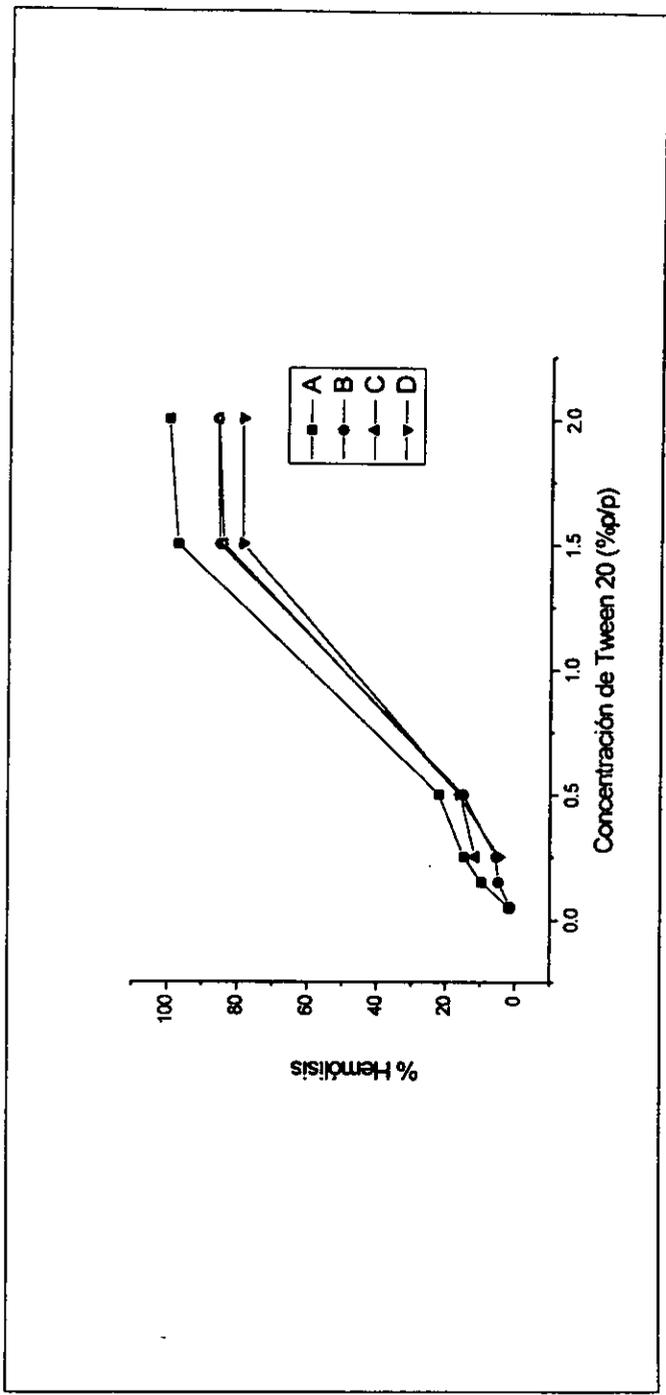


Figura 2. Representación gráfica de hemólisis producida por Tween 20 a diferentes concentraciones celulares.
 A. 1.6×10^8 , B. 3.2×10^8 , C. 5.0×10^8 , D. 8.0×10^8 cel/ml.

De las curvas de % de hemólisis (Anexos A, B, C, y D), las cuales fueron sometidas a regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, se obtuvieron los valores correspondientes a a_x y b_x de acuerdo a la ec. 1 para producir un x % de hemólisis (Anexos E, F, G, H, I).

La figura 3 representa los valores de C_x correspondientes a cada tensoactivo para producir el 50% de hemólisis en cada concentración celular. El valor de la pendiente corresponde a lo que se ha denominado Actividad Hemolítica Intrínseca. Un valor de pendiente menor (y por lo tanto una Actividad Hemolítica Intrínseca menor) significa una toxicidad mayor, ya que la mínima cantidad o concentración de tensoactivo incorporado a la membrana causa hemólisis, produciendo mayor toxicidad.

La figura 4 representa la relación entre el % de hemólisis y la concentración de tensoactivo adsorbido a la membrana en moléculas por célula. La ordenada al origen a_0 es la concentración que puede incorporarse a la membrana sin causar hemólisis en la célula. Como se muestra en la Tabla I, la toxicidad disminuye en el orden de $C_{16}E_{10}$, $C_{18}E_{20}$, Tween 20, $C_{12}Z$ y C_8 Gluco. Lo cual no corresponde al orden de toxicidad planteado anteriormente. Esto demuestra que aún no existe un parámetro cuantitativo válido para determinar la toxicidad de un tensoactivo en membrana.

Tabla I

Tensoactivo	a_0 10^{10} moléc./célula
C_8 Gluco	35.8
$C_{12}Z$	22.4
Tween 20	9.51
$C_{16}E_{10}$	0.3196
$C_{18}E_{20}$	1.09

La cantidad de tensoactivo incorporado a la membrana hace que $C_{16}E_{10}$ sea el tensoactivo más tóxico y el menos tóxico sea C_8 Gluco, quizá porque este en su estructura sea similar a los azúcares del eritrocito y esto lo hagan menos tóxico. Esto indica que no hay relación en el tamaño de la cadena y la toxicidad producida por los 5 tensoactivos no iónicos utilizados.

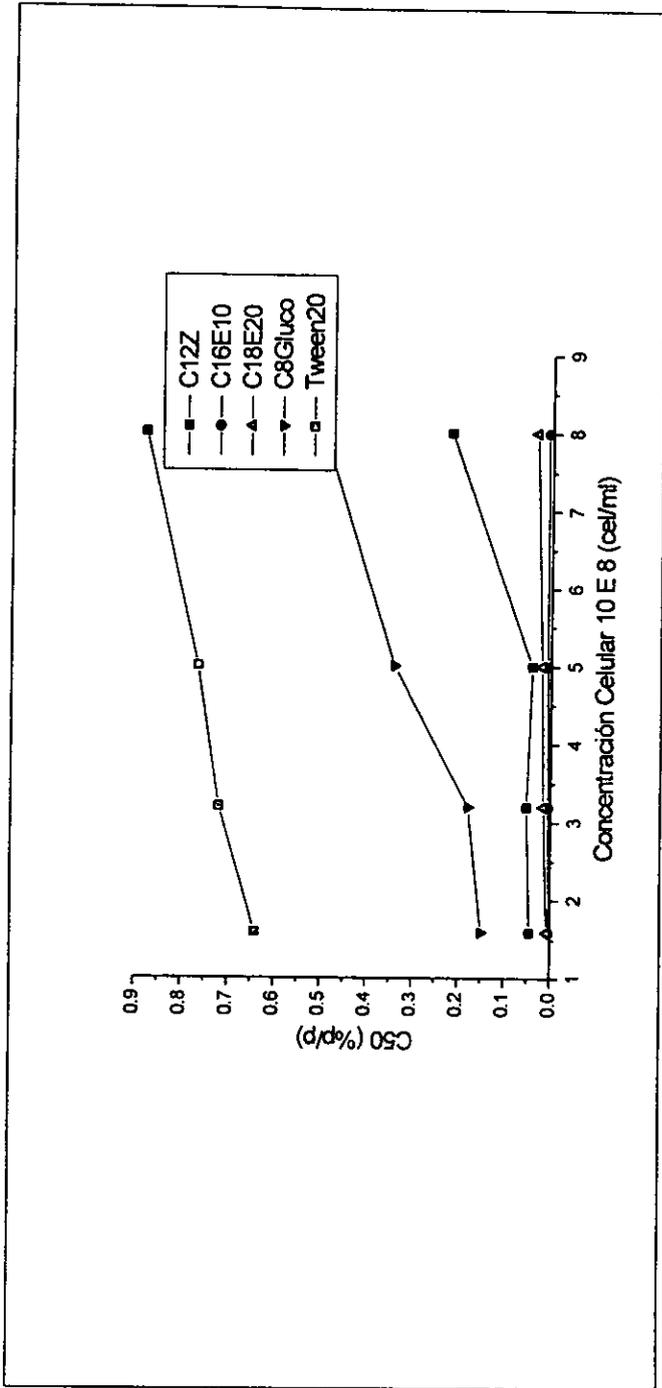


Figura 3. Concentración de tensoactivo requerida para producir 50 % de hemólisis en eritrocitos humanos.

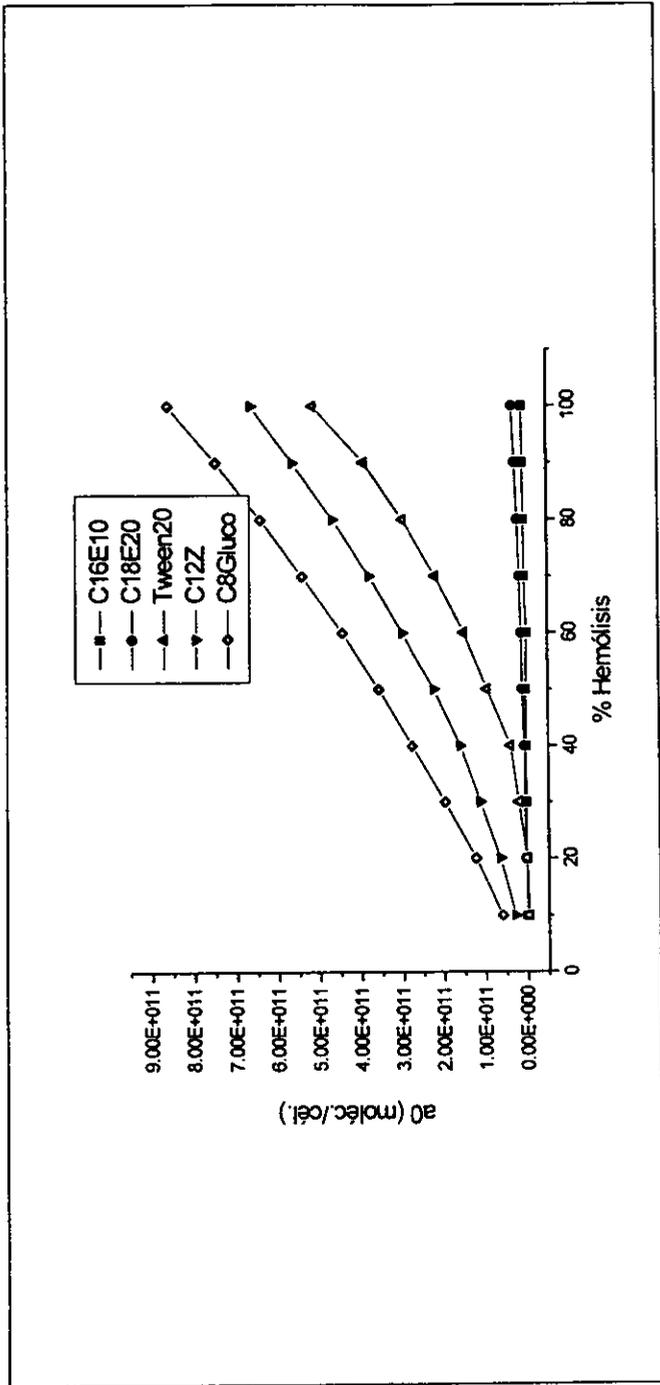


Figura 4. Relación entre la cantidad adsorbida por célula y el porcentaje de hemólisis producido por el tensoactivo.

Al analizar los valores de HLB de los tensoactivos analizados, parece no existir relación debido a que para los tensoactivos de 16 y 18 carbonos el valor aumenta, pero para el tensoactivo Tween 20 que posee 12 carbonos su valor se encuentra por encima de los anteriores.

Los pesos moleculares de los tensoactivos más tóxicos analizados son del orden de 282 y 1152 correspondientes a los tensoactivos $C_{16}E_{10}$ y $C_{18}E_{20}$, respectivamente. Los tensoactivos menos tóxicos poseen pesos moleculares de 1010 y 292 los cuales corresponden a Tween 20 y C_8 -Glucosido, lo cual demuestra que no existe relación alguna entre la toxicidad producida por los tensoactivos no iónicos analizados y su peso molecular.

IV. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos :

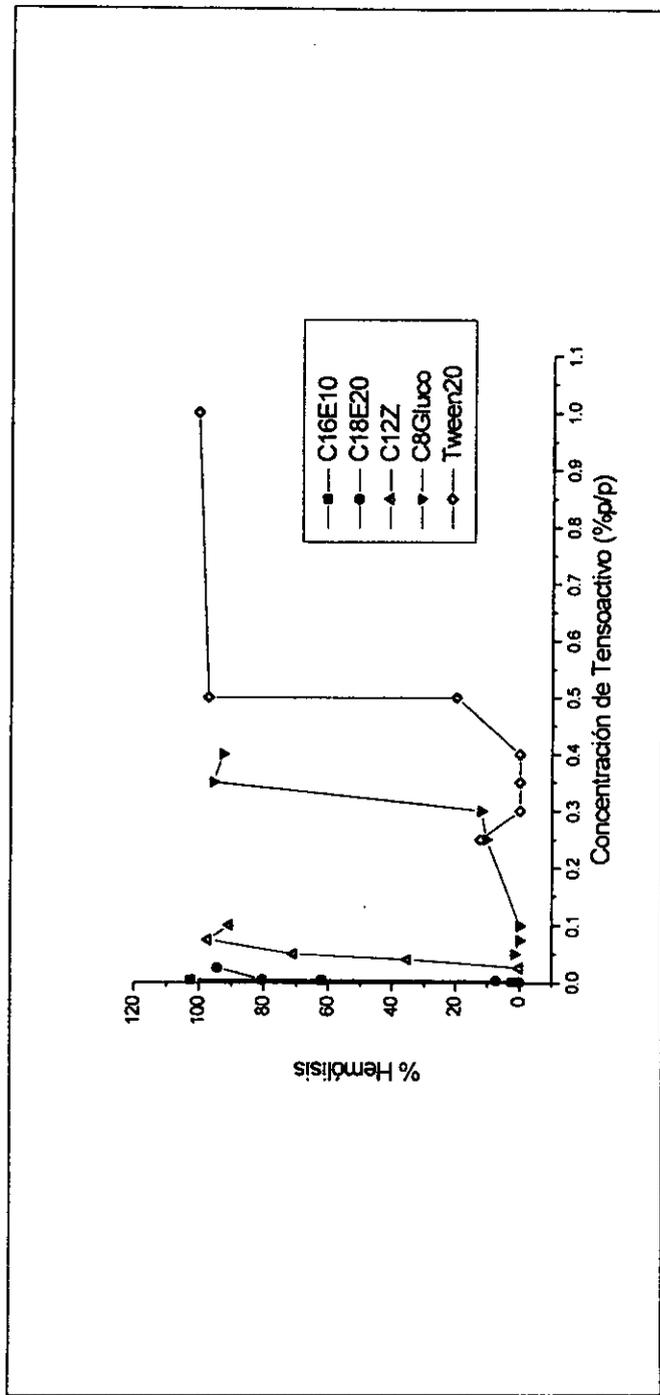
1. El orden de toxicidad propuesto para los tensoactivos no iónicos estudiados es POE (C_{16}), POE (C_{18}), Anfotérico (C_{12}), Carbohidrato (C_8), Derivado del Sorbitol (Tween 20).
2. La concentración de tensoactivo que se puede incorporar a la membrana sin causar hemólisis a_0 en moléc./cel. es C_8 Gluco, $C_{12}Z$, Tween 20, $C_{16}E_{10}$ y $C_{18}E_{20}$.
3. No hay relación entre la toxicidad producida por los tensoactivos analizados y la concentración que puede incorporarse a la membrana sin causar hemólisis en la célula a_0 .
4. No existe relación entre la toxicidad y los valores de HLB, como anteriormente lo había corroborado Miyajima.¹¹
5. El peso molecular no se relaciona con la toxicidad producida por los tensoactivos estudiados.
6. Se corrobora a Tween 20 como el tensoactivo no iónico de elección en productos farmacéuticos, ya que existen datos en la literatura de ser el tensoactivo menos tóxico.
7. El mecanismo de acción producido por tensoactivos en membrana no está comprendido y por lo tanto es difícil predecir su toxicidad.
8. También se considera que el incremento de la concentración del tensoactivo provoca la formación de micelas impidiendo el contacto de un mayor número de células y disminuyendo su poder hemolítico y por lo tanto tóxico.
9. La toxicidad en membrana eritrocítica no es un método que se pueda validar, ya que utiliza factores biológicos.
10. Aunque existen otros métodos para evaluar la toxicidad de tensoactivos en membrana entre los que se encuentran toxicidad ocular, en piel e intestino, etc. el utilizado en el presente estudio es el de primera elección por ser el más reproducible.
11. Se recomienda hacer estudios más amplios para armonizar los parámetros empleados para la evaluación de la toxicidad de tensoactivos.

Bibliografía

1. Remington, J. P. "Farmacia". 17a. edición. Vol. I. Médica Panamericana. México. 1992
2. Helenius, H., Simons, K. 1975. *Solubilization of membranes by detergens*. Biochimica et Biophysica Acta. 415, 29-79.
3. Attwood, T. and Florence, A.T. "Surfactants Systems, Their Chemistry, Pharmacy and Biology". Chapman and Hall. London. 1983.
4. Benson, F.R. 1992. *Polyol Surfactants. Nonionic Surfactants*. 1, 285-286
5. Porter, M.R. *Handbook of Surfactants*. Capítulo 7. Vol.2. Chapman & Hall. USA 1992
6. Stryer, L. *Bioquímica*. 4a. edición. Tomo II. Reverté. México 1995
7. Isooma, B., Hagerstand, H. & Paatero G. *Membrane Alteration Induced by Amphiphiles. Scandinavian Cell. Toxicology Congress 9*, 274-279.
8. Sheetz, M. P. & Singer, S. J. 1976. *Equilibrium and Kinetic. Effect of drugs on the shapes of human erythrocytes*. The Journal of Cell Biology. 70, 247-251.
9. Reman, F.C., Demel, R.A., De Gier, J. Van Deenen, L.L.M., Eibl, H. and Westphal, O. 1969. *Chemical. Physical Lipids*. 3, 221-233.
10. Thron, C. D. 1964. *Hemolysis by Holothurin A, Digitonin, and Quillaia Saponin : Estimates of the required cellular lysin uptakes and free lysin concentrations*. Journal of Pharmacology. 145,194-202.
11. Mijayima, K., Baba, T. and Nakagaki, M. 1987. *Polymer Science. Hemolytic activity of polyoxy ethylene cholesteryl ethers*. Colloid & Polymer Science 265, 943-949.
12. Matsuzaki, K. 1988. *Quantitative Analysis of Hemolytic Action of Lysophosphatidylcholines in Vitro : Effect of Acyl Chain Structure*. Chemical Pharm. 36(11) 4253-4260.
13. Zaslavsky, B. 1978. *Action of surface-active substances on biological membranes : Hemolytic activity of nonionic surfactans*. Biochimica et Biophysica Acta. 507, 1-7.
14. Zaslavsky, B. 1978. *Action of surface-active substances on biological membranes : Comparison of hemolytic activity of ionic and nonionic surfactans*. Biochimica et Biophysica Acta. 510, 151-159.

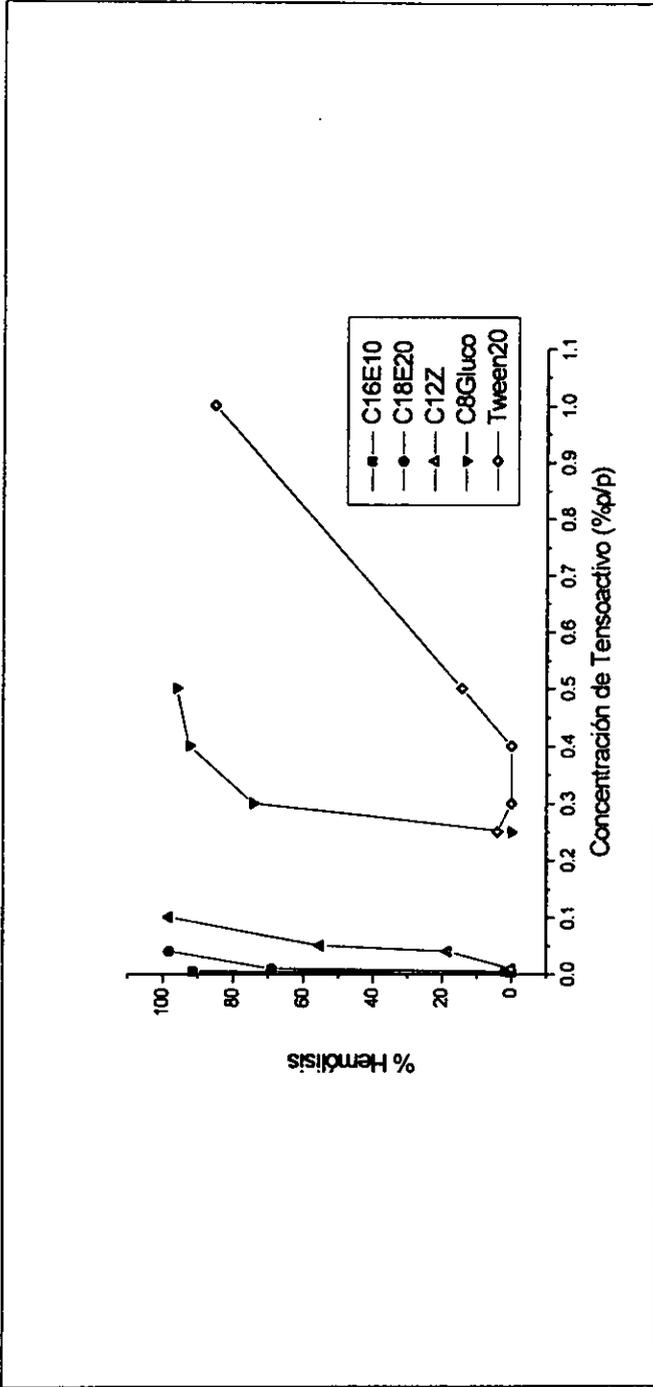
15. Sterzel, W. 1992. *Toxicology of surfactans used in cosmetics*. *Biosurfactans and Biotechnology*. 25 (68) 557-571.
16. Batnik.1991. *Interactions with proteins, enzymes and membranes*. *Anionic Surfactans*. 43, 31-35.
17. Cell Culture. SIGMA Bio Sciences. Catalogue and Price List. 1987

Anexo A



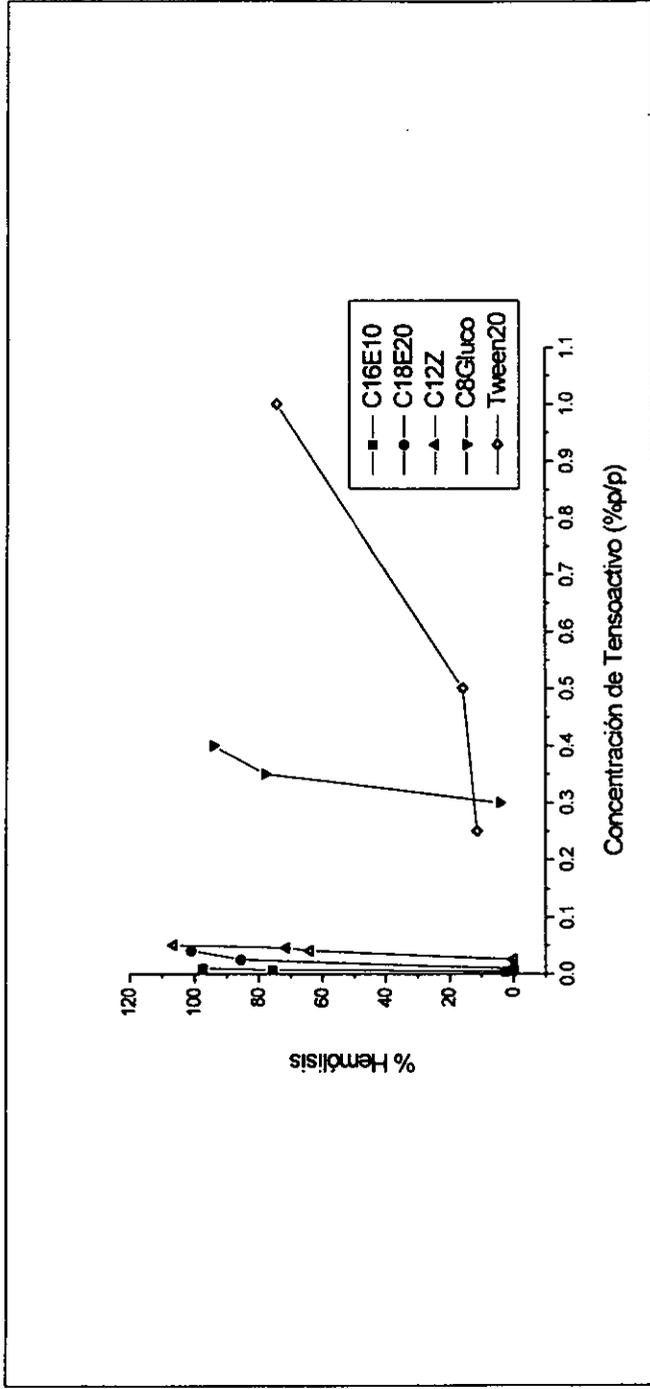
Concentración celular 1.6×10^8 cel/ml

Anexo B



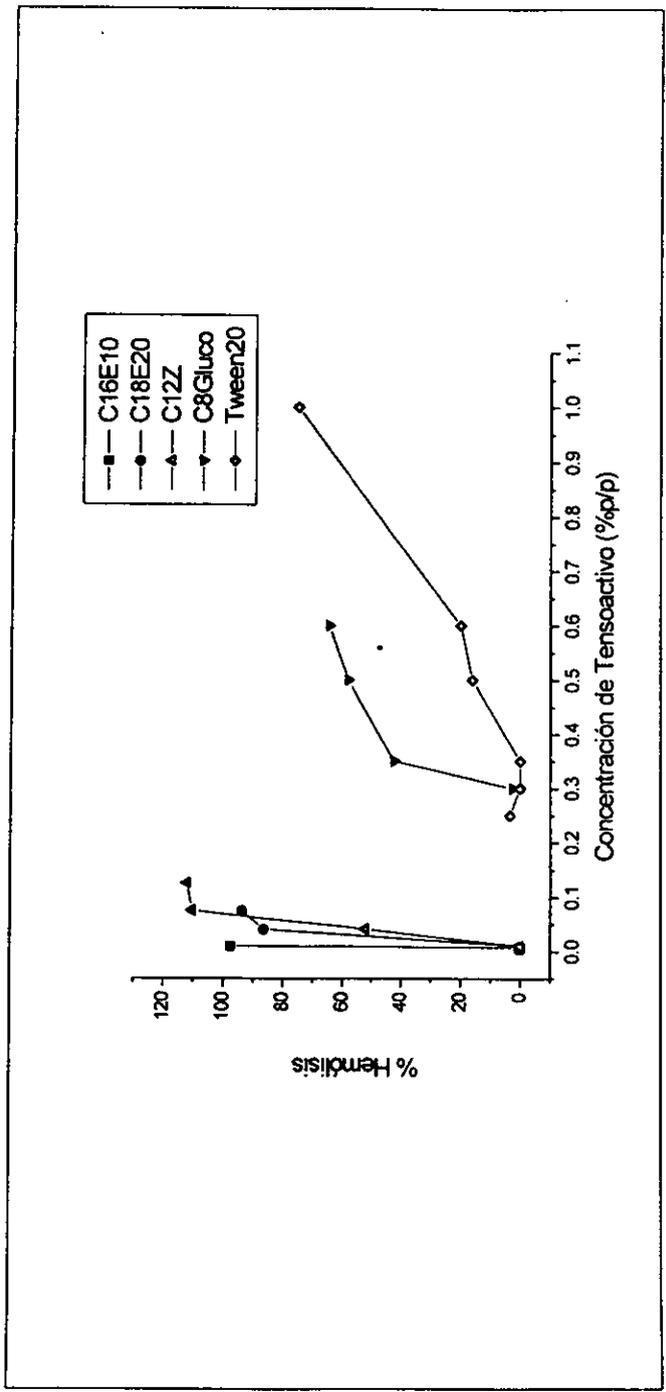
Concentración celular 3.2×10^8 cel/ml

Anexo C



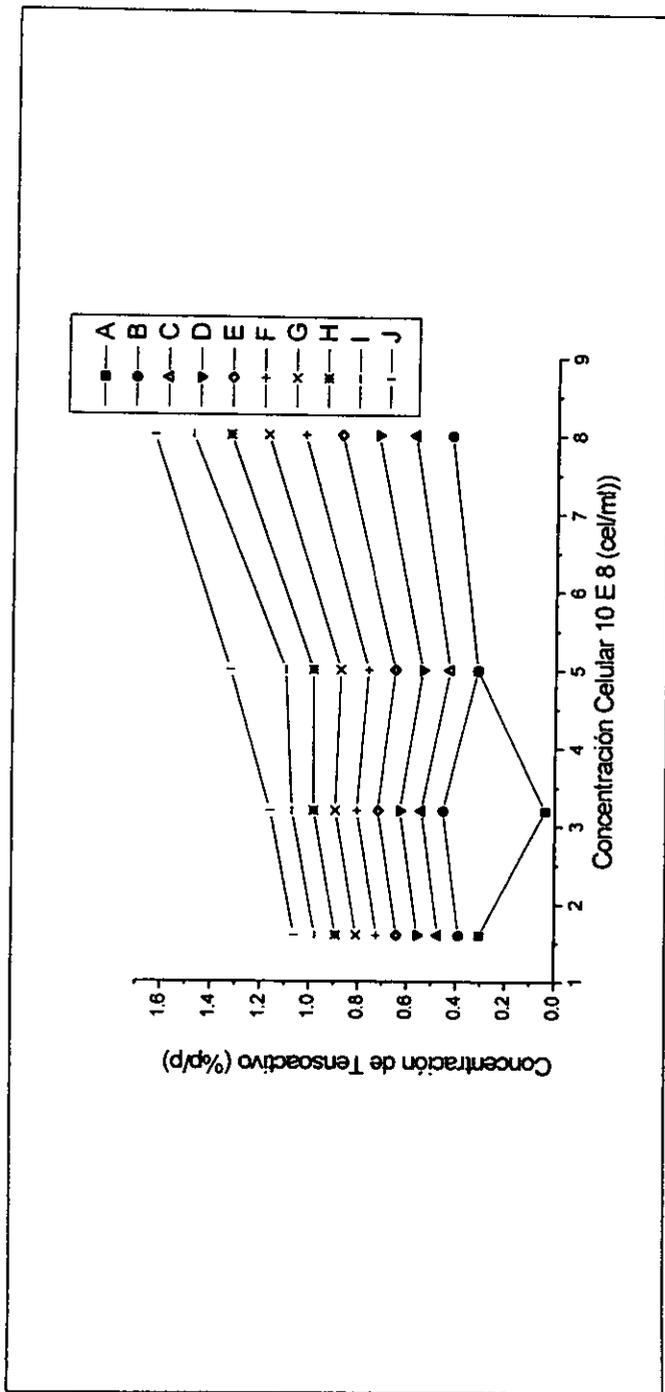
Concentración celular 5.0×10^8 cel/ml

Anexo D



Concentración celular 8.0×10^8 cel/ml

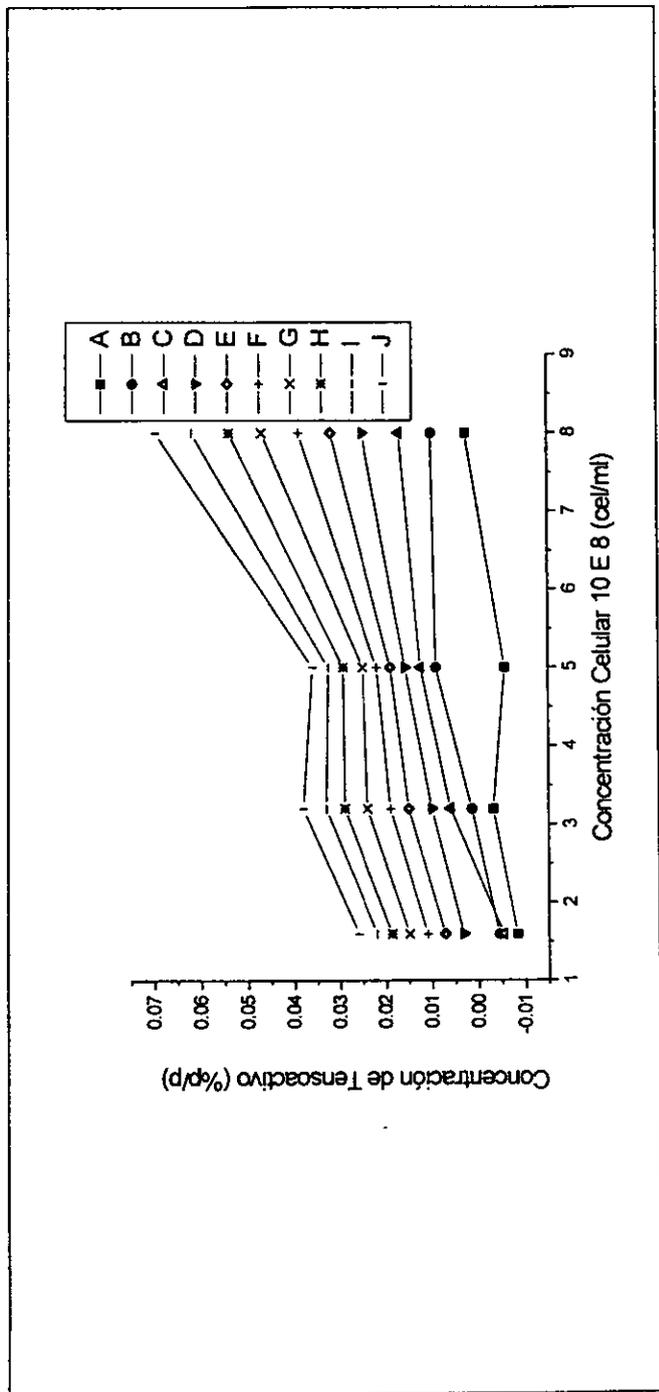
Anexo E



Relación entre la concentración de Tween 20 requerida para producir x % de hemólisis a las diferentes concentraciones celulares utilizadas en el estudio.

A. 10%, B. 20%, C. 30%, D. 40%, E. 50%, F. 60%, G. 70%, H. 80%, I. 90%, J. 100% de hemólisis

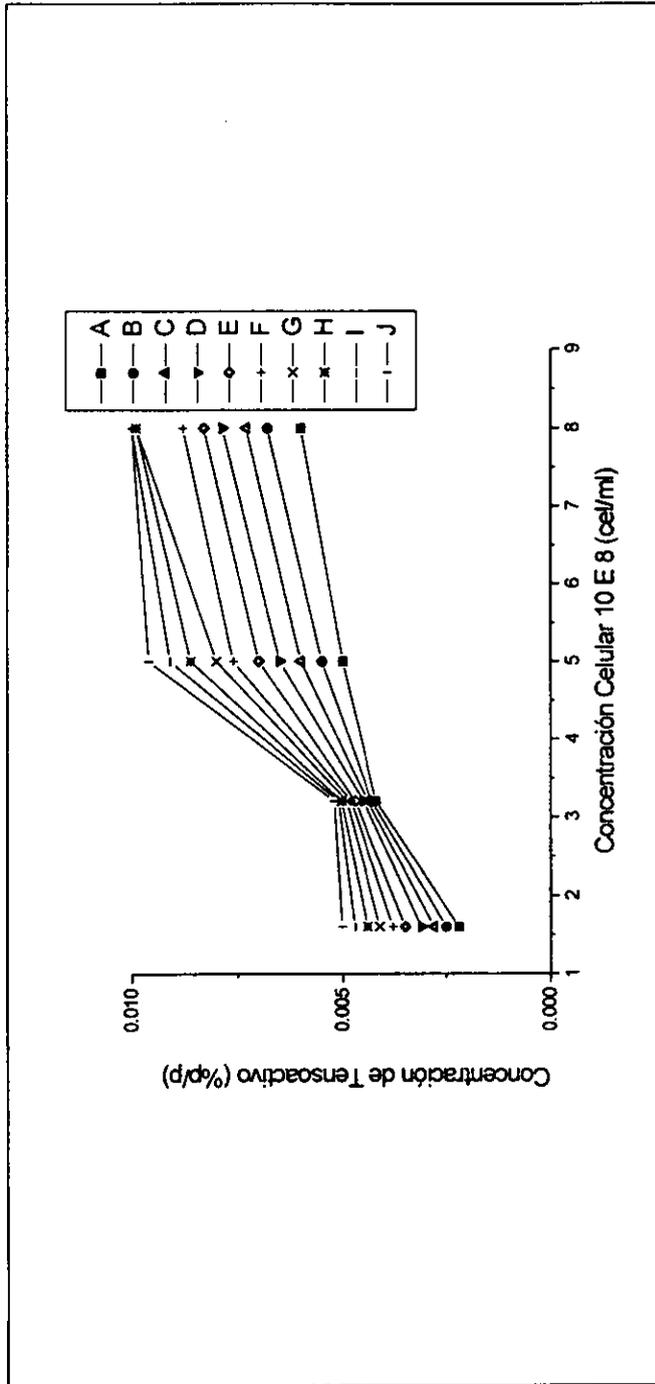
Anexo F



Relación entre la concentración de $C_{18}E_{20}$ requerida para producir x % de hemólisis a las diferentes concentraciones celulares utilizadas en el estudio.

A. 10%, B. 20%, C. 30%, D. 40%, E. 50%, F. 60%, G. 70%, H. 80%, I. 90%, J. 100% de hemólisis.

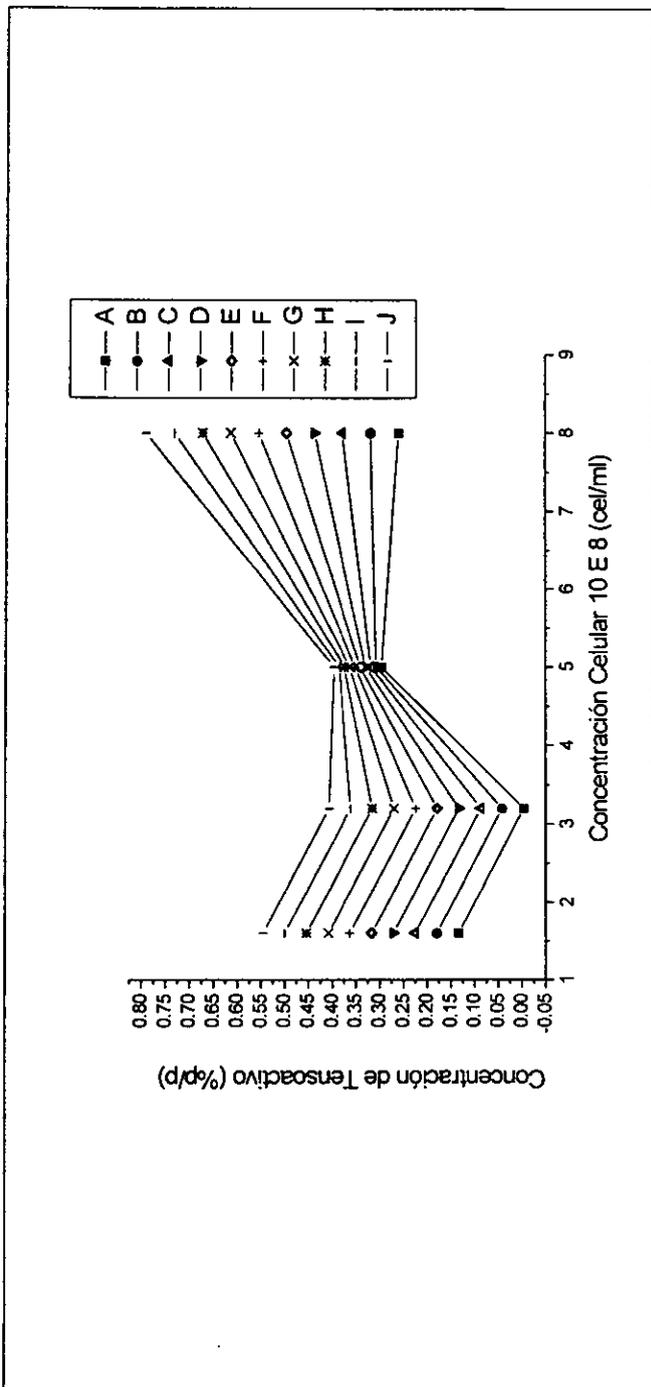
Anexo G



Relación entre la concentración de $C_{16}E_{10}$ requerida para producir x % de hemólisis a las diferentes concentraciones celulares utilizadas en el estudio.

A. 10%, B. 20%, C. 30%, D. 40%, E. 50%, F. 60%, G. 70%, H. 80%, I. 90%, J. 100% de hemólisis.

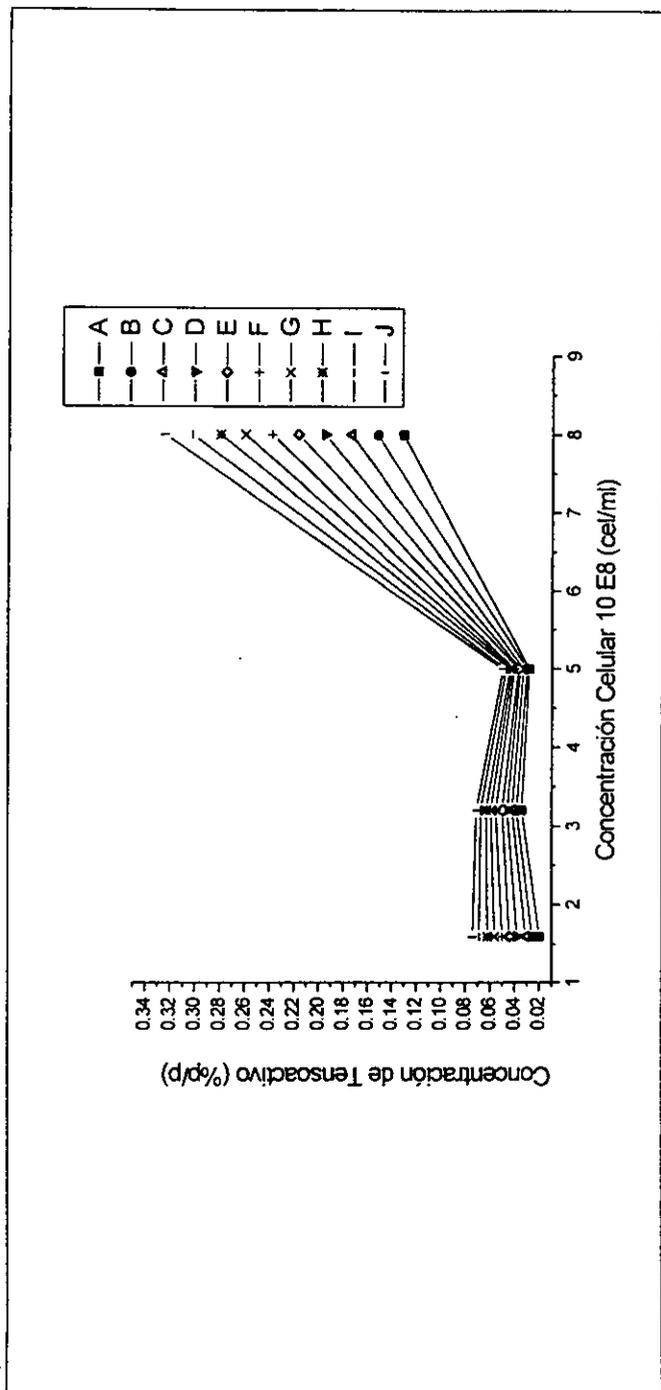
Anexo H



Relación entre la concentración de C_9 Gluco requerida para producir x % de hemolisis a las diferentes concentraciones celulares utilizadas en el estudio.

A. 10%, B. 20%, C. 30%, D. 40%, E. 50%, F. 60%, G. 70%, H. 80%, I. 90%, J. 100% de hemolisis.

Anexo I

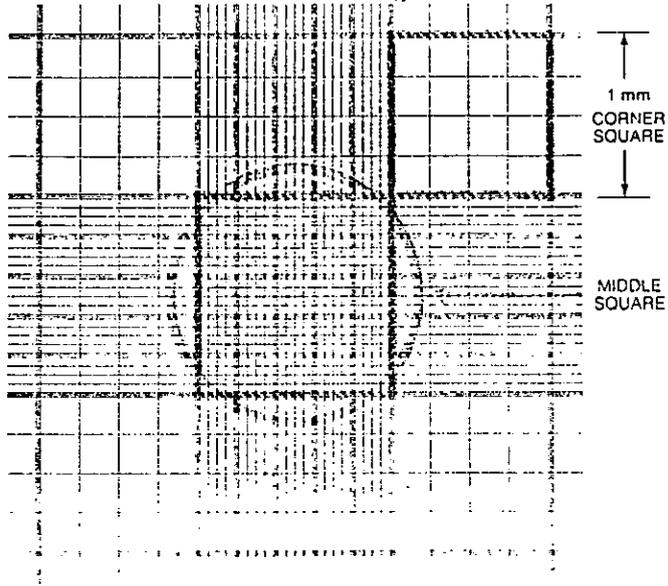


Relación entre la concentración de $C_{12}Z$ requerida para producir x % de hemólisis a las diferentes concentraciones celulares utilizadas en el estudio.

A. 10%, B. 0%, C. 30%, D. 40%, e. 50%, F. 60%, G. 70%, H. 80%, I. 90%, J. 100% de hemólisis.

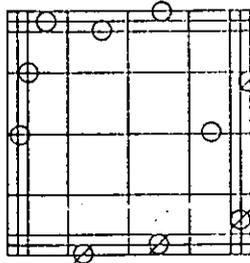
Anexo J

DIAGRAM I
STANDARD HEMOCYTOMETER CHAMBER



The circle indicates the approximate area covered at 100x microscope magnification (10x ocular and 10x objective). Include cells on top and left touching middle line (○). Do not count cells touching middle line at bottom and right (⊙). Count 4 corner squares and middle square in both chambers (one chamber represented here).

DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)



Count cells on top and left touching middle line (○). Do not count cells touching middle line at bottom and right (⊙).