

PRUEBA DE TOLERANCIA IN VITRO CON ERITROCITOS PARA MEDIR EL POTENCIAL DE IRRITABILIDAD DE LOS SURFACTANTES

IN VITRO TOLERANCE TRIAL WITH RBCs FOR MEASURE THE IRRITANCY POTENTIAL OF SURFACTANTS

John J. VALLEJO O.,^{1*} Carla C. CASTRILLÓN O.,¹ Sandra M. GARZÓN M.¹ y Newar A. GIRALDO A.¹

RESUMEN

Los tensoactivos utilizados como materia activa de productos cosméticos, de higiene, aseo y limpieza, pueden llegar a producir irritación dérmica y lesión en la membrana ocular. En éste trabajo se estudia una prueba asequible, económica y sencilla que permita evaluar la concentración a la cual los tensoactivos pueden producir irritación ocular. La prueba consiste en medir la hemólisis y la desnaturalización de proteínas causada por una concentración de surfactante, en una muestra de eritrocitos previamente caracterizada, empleando como indicador para ambos procesos la liberación de oxihemoglobina, la cual se detecta espectrofotométricamente. Los resultados obtenidos en esta prueba, muestran la viabilidad del método, y hacen de éste una herramienta alternativa para la evaluación del potencial de irritación ocular que poseen los tensoactivos.

Palabras clave: *Tensoactivos, eritrocitos, oxihemoglobina, SDS.*

ABSTRACT

The tensoactives, used as active matter of cosmetic, hygienic and cleaning products, may produce dermatitis and damage in the ocular eye membrane. To avoid thios it is necessary to implement in our enviroment an inexpensive and simple test to examine the concentration at which tensoactives can produce haemolysis and protein denaturizing processes, in a previously characterized both process the oxihemoglobinrelease, which is determined pectrophometrically. The results obtained in this test demonstrate that the method is viable and constitutes an alternative tool for the evaluation of the ocular irritation degree, acused by tensoactives.

Keywords: *Tensides, red blood cell, oxyhemoglobin, SDS.*

1 Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A. 1226 Medellín-Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: javao@epm.net.co

INTRODUCCIÓN

En el mercado existen gran variedad de tensoactivos utilizados como materia activa surfactante en productos cosméticos, de higiene, aseo y limpieza, los cuales potencialmente pueden llegar a producir irritación y lesiones en la membrana ocular (Osorio J., Orozco J). Por esta razón es necesario diseñar e implementar pruebas de tolerancia in vitro, económicas y fáciles de realizar, que permitan determinar la concentración de tensoactivo(s) que ejerza el efecto funcional deseado, sin producir daño a la membrana ocular (Pape Wolfgang).

Existen leyes donde se estipula que los productos cosméticos que se comercialicen, deben estar soportados por una documentación, que indique concretamente su composición y en especial los ensayos de toxicidad y de tolerancia, con el fin de apoyar las proclamas postuladas para el producto (Colipa, Ed); de ahí la importancia de implementar en nuestro país pruebas de tolerancia in-vitro validadas dentro de un programa de aseguramiento de calidad, que apoyen el desarrollo de los productos cosméticos y la posible expansión, comercialización e incursión en otros mercados.

Uno de los frentes de la investigación especializada en estos temas, está encaminado a la evaluación de los productos cosméticos utilizando métodos alternativos a los ensayos realizados con biomodelos (Danny Penman). La unión Europea realiza grandes esfuerzos en el desarrollo e implementación de nuevas técnicas para evaluar la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos; dentro de su regulación, se encuentra la norma 86/609 del Comité de ética Europeo (EEC), la cual enfatiza que solo se emplearán animales en ensayos de laboratorio siempre y cuando se demuestre que los resultados experimentales no pueden obtenerse por otros procedimientos o alternativas" (VALK, Jan Van, et al).

El ensayo in vitro utilizando eritrocitos (RBC's), es un método alternativo a la utilización de animales de laboratorio, que permite evaluar el potencial efecto irritante de los tensoactivos, por medio de la cuantificación de la hemólisis y desnaturalización de proteínas que ellos pueden ejercer sobre los eritrocitos. En dicho proceso, la oxihemoglobina liberada es el indicador empleado y es detectada espectrofotométricamente (W.J. P. U. Hoppe). Los

resultados de esta prueba presentan buena sensibilidad, confiabilidad y reproducibilidad y permiten su correlación con los efectos producidos por los tensoactivos sobre el globo ocular de conejo, según el Test de Draize (Waggoner W.C); perfilándola como una herramienta alternativa y/o complementaria en los procesos de evaluación de la tolerancia ocular de los agentes surfactantes (Pape Wolfgang)

En Colombia, la falta de normatividad especializada y de ensayos validados para verificar las promesas que ofrecen los fabricantes de productos cosméticos, de higiene, aseo y limpieza, ha facilitado que algunos no provean pruebas de apoyo para verificar parámetros de tolerancia, eficacia, y funcionalidad necesarios para brindarle seguridad al consumidor. De ahí que este procedimiento pueda ser una herramienta accesible para abordar la evaluación de tolerancia ocular producida por estos insumos.

Alcance

Este trabajo desarrolló la prueba de RBCs con el Dodecil sulfato sódico (SDS) como tensoactivo de referencia y comprende la primera parte de un proyecto que propone la implementación del método validado sobre otros tensoactivos comerciales que son básicos en las formulaciones del sector cosmético, de tal modo que pueda adoptarse como herramienta y criterio en la declaración de proclamas de tolerancia ocular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4), Cloruro de sodio (NaCl), Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), solución hipotónica de PBS (Phosphate Buffer Solution), Eritrocitos (N° células $5.29 \times 10^6/\mu\text{L}$), Dodecil sulfato sódico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$) grado p.a, Cetil trimetil amonio bromuro ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) grado p.a. y agua destilada.

Evaluación de la materia activa surfactante del SDS: Se cuantifica la pureza del tensoactivo Dodecil sulfato sódico (SDS) valorándolo con el tensoactivo catiónico Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) grado p.a, siguiendo el método ICONTEC (NTC 1187/98).

Preparación del PBS: A un balón de 1000 ml se adicionan 800 ml de agua destilada 1.6 g de Na_2HPO_4 (ó 22.2 mmol/l), 0.4 g de KH_2PO_4 (ó 5.6 mmol/l), 58.5 g de NaCl (ó 123.3 mmol/l) y 1g de glucosa (ó 10.0 mmol/l). Se ajusta a pH = 7.4 y se completa volumen.

Los equipos empleados para el desarrollo experimental fueron: tubos vacutainer®, centrífuga, ultracentrífuga, cubetas de cuarzo de un $(1)\text{cm}^3$, espectrofotómetro UV-Visible, micropipetas, pHmetro, balanza analítica, gradillas para tubo de ensayo y envases de vidrio ámbar.

Preparación de la muestra: Se recolectan dos muestras de cinco (5) ml de sangre fresca y se adicionan en tubos tipo vacutainer®. Estas muestras se centrifugan a 1500 rpm x 15 minutos a temperatura ambiente, luego se separa cuidadosamente el plasma de la superficie de los tubos (sobrenadante), posteriormente se lavan los eritrocitos cuatro veces con solución hipotónica de PBS, pH = 7.4 mezclando y centrifugando por dos (2) minutos con el fin de eliminar otras células y residuos del medio.

Etapa de hemólisis y desnaturalización

En viales limpios y secos se adicionan las cantidades de SDS al 1% (g/ml), PBS y solución de células de sangre roja (RBCs) expresadas en el diseño experimental. Los viales son incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación constante a temperatura ambiente, terminando el periodo de incubación con centrifugación a 10000 rpm por un (1) minuto. Para la **hemólisis** se mide la absorbancia del sobrenadante a $\lambda=560$ nm, utilizando como blanco una solución de SDS al 1% (g/ml) preparada en PBS. Finalmente con las absorbancias obtenidas se realiza la curva de actividad hemolítica (concentración Vs respuesta) y se deduce la concentración media máxima hemolítica del tensoactivo (Pape and Hoppe, 1990); para la etapa de **desnaturalización**, se mide la absorbancia del sobrenadante a $\lambda=560$ y 575 nm con el fin de evidenciar el rango de desnaturalización que ejerce el tensoactivo sobre la población de eritrocitos en estudio. El cociente de las lecturas de la hemólisis y la desnaturalización genera el índice de desnaturalización (ID), el cual en relación con el Test de Draize, muestra la capacidad del tensoactivo para coagular las proteínas y producir opacidad en la cornea (W. J. P. U. Hoppe).

Con la actividad hemolítica máxima del tensoactivo y el índice de desnaturalización obtenido se calcula la relación lisis / desnaturalización, que otorga el valor que se compara con los rangos de irritancia ocular reportados en el Test de Draize (Pape and Hoppe, 1990).

Diseño experimental

La metodología se desarrolló con base a tres frentes realizados por etapas: calificación del tensoactivo, hemólisis y desnaturalización. Estas etapas se trabajaron por duplicado.

Etapa de calificación del tensoactivo

Se valoró la materia activa surfactante del tensoactivo y con el resultado dentro del rango de aceptación, se cuantificó la serie de concentraciones que permiten observar gráfica y cuantitativamente la actividad del tensoactivo en las etapas de hemólisis y de desnaturalización, permitiendo hallar la concentración media máxima de hemólisis (HB50) y el índice de desnaturalización (ID).

Etapa de hemólisis

Tabla 1. Hemólisis de eritrocitos con diferentes concentraciones de SDS

N° de vial	Volumen de RBC's (μL)	Volumen de PBS (μL)	Volumen de SDS al 1% (μL)	[] final del SDS al 1% (ppm)
1	25	975	0	0
2	25	965	10	10
3	25	955	20	20
4	25	945	30	30
5	25	935	40	40
6	25	925	50	50
7	25	915	60	60
8	25	905	70	70
9	25	895	80	80
Blanco				
10	0	875	125	125
0% hemólisis				
11	25	975	0	0
100% hemólisis				
12	25	Se llevó a 1 ml con agua destilada		

Estos análisis fueron realizados por duplicado. El primer análisis llamado hemólisis A y el segundo llamado hemólisis B.

Etapa de desnaturalización

Tabla 2. Desnaturalización de los eritrocitos por acción del SDS.

N° de vial	Volumen de RBC's	Volumen de PBS	Volumen de SDS al 1% (µL)
1	25	875	100
Blanco			
2	0	900	100

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa de calificación del tensoactivo

La valoración de la potencia del Dodecil sulfato sódico (SDS) grado p.a reveló un porcentaje promedio de materia activa del 99.2%; lo cual se encuentra dentro de la especificación y rango de aceptación para dicho insumo. Este resultado soporta los estimativos de la concentración de SDS que se utiliza en las etapas de hemólisis y desnaturalización en la prueba de RBCs.

Etapa de hemólisis

Con los datos obtenidos en la etapa de hemólisis se construyó un gráfico (figura 1) de absorbancia vs concentración a $\lambda=560\text{nm}$, que permitió estimar la actividad hemolítica máxima del tensoactivo sobre la población de eritrocitos en estudio, denominada concentración media máxima hemolítica del tensoactivo (HB50).

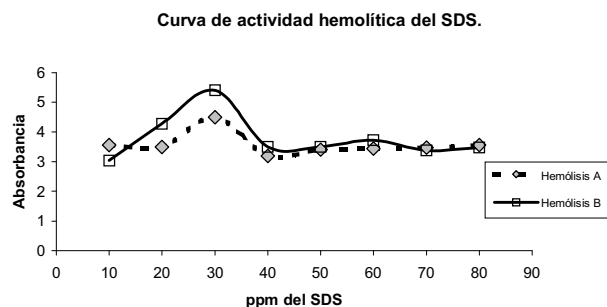


Figura 1. Gráfico de la Absorbancia vs Concentración de SDS a $\lambda=560\text{ nm}$. (ejes X e Y en escala decimal.) Que muestra la región donde el 50% de la población de los eritrocitos sufre hemólisis por acción de una determinada concentración de tensoactivo.

Los resultados que se muestran en la figura 1, indican que entre 10 y 40 ppm de SDS se encuentra el punto máximo de liberación de oxihemoglobina en esta etapa y evidencian la concentración de SDS en la cual hay una actividad hemolítica máxima sobre los eritrocitos. Matemáticamente, en este intervalo la curva presenta una tendencia polinómica de grado dos (Véase Figura 2); teniendo como criterio la primera derivada de dicha ecuación e igualándola a cero, obtenemos la concentración del tensoactivo (X) a la cual se presenta la máxima absorbancia (Y). Esta concentración se reconoce en esta aplicación como la concentración media máxima efectiva del tensoactivo para producir hemólisis (HB50).

También se puede desatacar en la figura 1 que a concentraciones mayores de 40 ppm no se produce un cambio significativo en la absorbancia, lo cual indica que el proceso de hemólisis culminó y que se inicia la etapa de desnaturalización en los eritrocitos.

Gráfico de la hemólisis de los eritrocitos por acción del SDS.

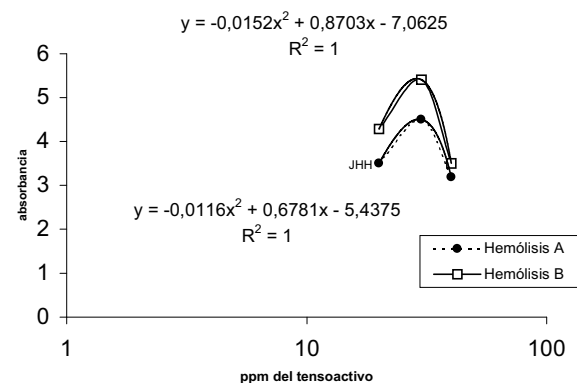


Figura 2. Absorbancia vs concentración para derivar el punto de máxima actividad hemolítica (HB50) a partir de la ecuación que rige la curva en esta región. (Eje X en escala logarítmica y eje Y en escala decimal)

Reemplazando en la ecuación, los resultados revelan que el punto máximo de actividad hemolítica para el SDS analizado se encuentra en 29 ppm indicando que en esa concentración el SDS produce hemólisis sobre el 50% de las células rojas que se encuentran en el vial; para los dos análisis A y B.

Es de destacar que los resultados de esta prueba se encuentra dentro de lo establecido en la literatura

para el SDS, la cual reporta que para este tensoactivo, el HB50 se halla entre 29.4 ppm +/- 3.7 (25.7- 33.1) con un nivel del 95% de confianza (Pape & Hoppe – 1990).

Etapa de desnaturalización

Luego del proceso de lisis de la membrana del eritrocito en la cual se libera oxihemoglobina, el tensoactivo libre continua en contacto con las estructuras del eritrocito, generando una descarga adicional de oxihemoglobina por la desnaturalización de proteínas, la cual es captada espectrofotométricamente a $\lambda=575\text{nm}$, a diferencia del proceso de hemólisis que es captado a $\lambda=560\text{nm}$.

Para analizar la etapa de desnaturalización, se evaluó la absorbancia de la oxihemoglobina liberada por los eritrocitos a $\lambda=560\text{ nm}$ y $\lambda=575\text{ nm}$, después de someter los eritrocitos a una concentración de tensoactivo de 100 ppm en la cual se prevé que el proceso hemolítico y de desnaturalización ya ha culminado.

Absorbancia del SDS al 1% a $\lambda_{560\text{ nm}} = 0.1125$

Absorbancia del SDS al 1% a $\lambda_{575\text{ nm}} = 0.1125$

El cociente entre ambos valores de absorbancia produce el índice de desnaturalización (ID) que para el SDS en esta etapa fue de 1.00 y expresado en escala porcentual corresponde al 100%; este valor lo convierte en el referente de la capacidad de irritancia ocular que poseen los tensoactivos. El resultado tiene buena correlación con los reportes bibliográficos (Pape Wolfgang).

Relación Lisis-Desnaturalización

La relación lisis-desnaturalización (L/D) en la prueba de tolerancia ocular para tensoactivos con RBC's, permite obtener valores que al clasificarse en rangos generan una escala comparable en atributos con otros ensayos que definen cualitativamente el daño producido por el mismo agente químico sobre el globo ocular, como el descrito en la prueba in vivo del test de Draize (Véase tabla 1).

Tabla 2. Clasificación de los surfactantes según su grado de irritación ocular (W.J. Pape, 1990)

Prueba In vivo	Relación Lisis/Desnaturalización
No irritante	>100
Ligeramente irritante	>10
Moderadamente irritante	>1
Irritante	>0.1
Muy irritante	<0.1

En el ensayo con RBCs la ponderación de la irritancia del surfactante se logra partiendo de los resultados obtenidos en las etapas de actividad hemolítica, debido a la lisis sobre la membrana celular del eritrocito y la posterior desnaturalización de sus proteínas. El cociente entre el Hb50 (L) y el ID (D) produce un nuevo valor (L/D), que se convierte en parámetro auxiliar en la evaluación de indicadores de citotoxicidad en los tensoactivos.

En este estudio para ambas muestras de SDS la relación Lisis/Desnaturalización = $29/100 = 0.29$

Comparando el resultado obtenido sobre la tabla 1, se deduce que el SDS se ubica en una posición irritante. Esto junto con los demás resultados obtenidos en esta prueba, muestran concordancia con la bibliografía consultada.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia ocular in vitro, demuestran la confiabilidad del método y la viabilidad de implementarlo como una herramienta para evaluar el potencial de irritación ocular que causan los tensoactivos empleados en la formulación de cosméticos y productos de higiene, aseo y limpieza.
- Los resultados que se obtienen en este estudio ofrecen valores de comparación para posteriores estudios sobre otros agentes surfactantes.
- Los valores que se obtienen, analizados en forma conjunta, no individual, permiten la ponderación del perfil citotóxico e irritante del agente tensoactivo en estudio.
- El diseño de formulaciones que involucran tensoactivos, puede ser asistido por el seguimiento de los resultados que produce este tipo de estudio y referenciados al comportamiento del SDS.
- La prueba puede ser realizada con recursos profesionales e instrumentales al alcance de nuestro medio y proyectarse como herramienta auxiliar en procesos de diseño, formulación y evaluación funcional de productos cosméticos y de higiene y limpieza.
- Para la consolidación del método bajo un marco de validación, se deben atender aspectos de

especificidad que tienen que ver con el seguimiento químico en la interacción tensoactivo-eritrocito y para esto es necesario ajustar sensibilidad en la detección y cuantificación química del tensoactivo.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad de Antioquia.
- A los profesores de la U de A; Amanda Mejía, Freimar Segura, Oscar Flórez, Rafael Salamanca, Pedro Amariles y Claudio Cartagena; y a los auxiliares Lucely Barrera, Mariluz Correa y Jorge Arango por su colaboración en el desarrollo de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colipa ED. (2002) Alternatives to animal testing, the European Cosmetic toiletry and perfumery association,. <http://www.colipa.com/alternatives.html>. Acceso 25 de julio de 2003
2. Instituto Colombiana de Normas Técnicas. Norma Técnica Colombiana N° 1187 segunda actualización de 799/ 1998.
3. Osorio J., Orozco J. (1996) Fisiología básica de las proteínas de membrana del glóbulo rojo. Veterinaria y Zootecnia Caldas (Manizales). 1 9 (1) 78:83.
4. Pape, Wolfgang. (1992) Red Blood Cell Test System. Beirsdorf AG. IP 37, Dept. of Biocompatibility and Immunology. Germany. 20 (2) 32:49
5. Pape, W.J.; H, U. (1991) Standardization of an in vitro Red Blood Cell Test for Evaluating the Acute Cytotoxic Potential of Tensides. Arzneimittel forschung. Drug research. 40 (4) 498:502
6. Pape, W.J.; Pfannenbecker, U.; Hoppe. U. (1998) Validation of the Red Blood Cell Test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation portencial of surfactants. Molecular Toxicology. 1 525:536
7. Penman, Danny. (2002) NewScientist, Animals experiments. <http://www.rediris.es/list/info/3erres.html> . Acceso 16 julio de 2003
8. Repetto.(1999) Constitución de Rema-Red española de métodos alternativos, Unión Europea. <http://europa.eu.int/eur-lex/es/oj/2000..> Acceso 23 de agosto 2003
9. República de Colombia, Congreso Nacional. Ley 84 de 1989 Artículo 23, IDEAM. <http://www.ideam.gov.co> Octubre, 2001.
10. Valk, Jan Van. (1999); et al. Alternatives to the use of animals in higher education. ATLA. 27 :39:52.
11. Waggoner W.(1990); et al. Human Ocular Irritation, Clinical Safety and Efficacy Testing Of Cosmetics. New York. pp 74:82.

Fecha de Recibo: Febrero 28 de 2003

Fecha de Aceptación: Febrero 24 de 2004

