

302827

N-13

2Ej.

UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS
A LA U.N.A.M.



"PRUEBAS ALTERNAS DE IRRITACION
DERMICA Y OCULAR PARA
PRODUCTOS DE HIGIENE CAPILAR"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ARIADNE LOPEZ GRACIDA

México, D. F.

1994

**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 está 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.

A Mis Padres

Olivia Gracida G.

Carlos López R.

*Gracias por haberme dado un ejemplo de
constancia, fortaleza y superación. Ustedes han
sido y serán mi guía en cada momento.*

Los quiero mucho.

*A la memoria de mis abuelos cuyo cariño estará
por siempre en mi corazón.*

*Manuela Rivera
Victor M. López*

*María Guerrero
Antonino Gracida*

*A mi tía
Flora Ma. Gracida*

*Gracias, por tu cariño, apoyo incondicional y
ejemplo de nobleza, gran influencia para lograr mis
metas en la vida.*

*A todas aquellas personas que a través de mi
vida han compartido algo de sí mismo conmigo.*

*A la Universidad Motolinía y a todos los
profesores que a lo largo de mi vida académica
han contribuido en mi formación profesional.*

Al H. Jurado

Al C. Ing. Juan B. Boué Peña

Gran ejemplo de profesionalismo, superación y constancia.

Mi más sincero agradecimiento por compartir conmigo sus invaluables conocimientos.

A él mi respeto y admiración por siempre.

*El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección
del Ing. Químico Juan B. Boué Peña, en los
Laboratorios BDF México, S.A. de C.V.*

*"Creemos que los animales no deben
sufrir por nuestra vanidad"*

*"La pregunta no es, si ellos pueden razonar.
Tampoco, si pueden hablar.
Pero ¿ Deben ellos sufrir ?"*

*J. Bentham
(1748 - 1832)*

INDICE

Pág.

CAPITULO I INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del Problema	1
1.2. Objetivo	2
1.3. Hipótesis	2

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1. Nace un Fenómeno Socio-científico	5
2.2. El Pelo	7
2.2.1. Estructura Química del Pelo	7
2.3. Cosméticos	9
2.3.1. El Champú	9
2.3.2. Seguridad de los Champúes	10
2.4. Irritación y Sensibilización cutánea y ocular	11
2.4.1. Pruebas para Determinar Irritación Dérmica y Ocular	12

CAPITULO III MATERIAL Y METODOLOGIA

3.1. Diagrama	16
3.2. Materiales, Reactivos y Aparatos.	17
3.2.1. Material Biológico	17
3.2.2. Material de Laboratorio	17
3.2.3. Reactivos	18
3.3. Metodología	18

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Resultados	25
4.1.1. Prueba Draize.	25
4.1.2. Ensayo en Córnea de Bovino	34
4.1.3. Prueba en Huevo de Gallina Fértil	35
4.1.4. Ensayo en Células Rojas	39
4.1.5. Prueba de Parche	41
4.1.6. Prueba Eytex	43
4.1.7. Crecimiento en Tubos de Polen	44
4.2. Discusión	46

CAPITULO V CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones	50
-------------------------	----

CAPITULO VI BIBLIOGRAFIA

6.1. Bibliografía	53
-------------------------	----

CAPITULO VII APENDICE

7.1. Condiciones Estándar de Extracción y Conservación	59
7.2. Condiciones de Humedad	59
7.3. Preparación de Córneas	59
7.4. Solución de Fluoresceína Sódica	59
7.5. Tipos de Reacción	59
7.6. Tratamiento de Eritrocitos	60
7.7. Solución Amortiguadora	60
7.8. Características del Parche	60

CAPITULO

I

INTRODUCCION

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La piel es la estructura de revestimiento de la superficie corporal que representa el límite entre nuestro organismo y el mundo exterior. Es en la piel y sus anexos como lo es el cabello, donde reside una buena parte de la belleza del ser humano, sin distinción de edad o sexo constituyendo una tarjeta de presentación, por lo que todo individuo desea tenerla lo más agradable posible.

El pelo en el hombre se ve revestido de una gran importancia psicológica y social que se ve contrastada con la carencia de función vital. Actualmente, la mayoría de personas recurren al uso de los champúes por lo que estos constituyen uno de los principales productos cosméticos utilizados por la sociedad a nivel mundial.

Durante el proceso de limpiar el cabello no es raro que algo del champú escurra por la cara y llegue a introducirse en los ojos, por lo que se hace necesario realizar pruebas que involucren la determinación de irritación dérmica y la ocular, ambas desarrolladas en animales siendo de la predilección los conejos por su respuesta tan similar a la que presenta el humano.

Con el pasar de los años y a medida que la ciencia ha avanzado, se fueron presentando pequeñas variaciones en los resultados, encontrando que los champúes utilizados por el público sin efectos nocivos ocasionaban irritación en los ojos de los conejos en prueba. Por otro lado el fuerte llamado de la sociedad protectora de animales para la detención del uso de ciertas especies en este tipo de pruebas provoca la búsqueda de alternativas para realizar los controles en el producto del cual cada vez es más extenso su mercado. Siguiendo este camino la presencia de pruebas In-vitro da una nueva pauta para su desarrollo, con la esperanza de que los métodos de análisis consigan una mayor precisión a la respuesta humana actual.

Hacia 1977 los champúes representaron el 43% del total del mercado de productos designados a la higiene capilar. Su clasificación como detergentes adecuados para el lavado del pelo, implica una constante experimentación acerca de diseño y tecnología para responder a los múltiples requerimientos, desde los más sofisticados hasta los más sencillos, y que van más allá de la simple finalidad de limpieza.

La constante innovación de un producto tan popular como lo es actualmente el champú, obliga al fabricante a ofrecer una seguridad plena al consumidor, descansando ésta responsabilidad sobre las pruebas de seguridad realizadas al producto; por ello se considera importante proporcionar datos sobre algunas de las posibles alternativas existentes para la determinación de irritación dérmica y ocular, en el uso de los productos de carácter cosmético correctivo destinados a la higiene capilar, los champúes.

1.2. OBJETIVO

Evaluar pruebas in-vitro para determinar la inofensividad de productos cosméticos destinados a la higiene capilar a fin de evitar el uso inadecuado de animales de laboratorio.

1.3. HIPOTESIS

Las pruebas utilizadas actualmente para valorar irritación dérmica y ocular in-vivo son:

- Prueba de Draize
- Dosis límite de respuesta
- Prueba de parche en animales

y como pruebas alternas in-vitro se utilizan entre otras:

- Prueba en huevo de gallina fértil

- Prueba en córnea de bovino
- Prueba Microtox (Eytex)

Las pruebas alternas proveen objetividad cuantificable para determinar la potencia de irritación de una sustancia química integrada a una formulación para champúes y dan la oportunidad de reducir el número de animales necesarios.

CAPITULO

II

ANTECEDENTES

2.1. NACE UN FENOMENO SOCIO-CIENTIFICO.

La historia de las pruebas para toxicidad y seguridad se remonta a viejos tiempos; donde grandes expertos dieron inicio al duro camino con innumerables inconvenientes a su paso.

Hace unos setenta años se desarrollaron pruebas, para comprobar la seguridad de medicamentos como antibióticos y sulfas. Se eligieron animales que ofrecían cercana correlación con los humanos, y con el tiempo se seleccionaron las mejores especies para realizar las pruebas de seguridad de los productos de uso cotidiano. Fue así como, gradualmente, las pruebas como DL₅₀ y Draize se incluyeron en reglamentaciones y protocolos para la industria farmacéutica. (1)

A finales de 1970, varios moralistas y grupos defensores de animales iniciaron un movimiento en contra del uso de animales para pruebas de laboratorios realizadas en la industria cosmética.

A la fecha, el grupo denominado " Movimiento Verdadero por los Animales " ha incrementado el número de sus voces combatientes, formando grupos amenazadores para las investigaciones biomédicas.

Este movimiento da inicio en Inglaterra en el siglo XIX, extendiéndose rápidamente al resto del mundo, específicamente a Estados Unidos y México. Actualmente ha aumentado por las siguientes razones: (10)

- Las pruebas en animales se han hecho una causa emocional, provocando de esta

manera la carencia de oposición de comunidades científicas y médicas. Una de las pruebas más conocidas para estos fines de seguridad es la de Draize, que data de 1944; esta prueba, desde luego, se usa para valorar medicamentos y cosméticos, productos que en general deben ofrecer seguridad al consumidor; al publicarse detalladamente la prueba, levantó numerosas protestas en contra de los laboratorios que recurrían a ésta y a favor de pruebas In-vitro. (9, 10)

Los científicos normalmente no se oponen a legislaciones federales y estatales, por lo que en algunos casos las investigaciones empezaron a sufrir serias amenazas por parte de los grupos protectores de animales. (29)

Otros investigadores abandonaron sus estudios por presiones que en algunos casos, llegaron hasta el cierre de laboratorios que se habían dedicado a la realización de pruebas de seguridad para cosméticos realizadas en animales. (3)

En 1988 la Academia Americana de Dermatología formó un comité el cual tendría la vigorosa labor de comparar las publicaciones similares, pero independientes, desde el punto de vista dermatológico.

El público se mostró indiferente a esta nueva medida, la cual podría servir de ayuda para infundir un balance y sentido común a la cuestión de tipo emocional creada en torno a las pruebas de seguridad realizadas en animales. La corriente de investigación para desarrollar metodologías de pruebas In-Vitro se vió incrementada en los últimos diez años. (23)

Estos son algunos de los aspectos que han ido dando forma e impulso al fenómeno socio-científico de nuestro tiempo.

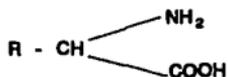
Debido a que este tipo de pruebas se inicia con los champúes, se dará una breve semblanza de lo que es el cabello y lo que es un champú:

2.2. EL PELO

Se denomina pelo a la producción filiforme que aparece en diversos puntos de la piel del hombre y de los animales. Sus propiedades se adaptan a los cambios estacionales, con mudas periódicas de pelos viejos y su sustitución por nuevos, formando parte del tejido tegumentario, el cual cumple funciones protectoras. (16, 26, 29)

2.2.1. ESTRUCTURA QUIMICA DEL PELO

La mayor parte del pelo está constituida por una sustancia proteica insoluble, denominada " Queratina ", -la cual se forma como producto final del proceso de queratinización que se lleva a cabo en el folículo. La queratina, como otras proteínas, se compone por aminoácidos, sustancias de fórmula general:



También se encuentran pequeñas cantidades de sustancias solubles en agua, como pentosas, fenoles, ácido úrico, glicógeno, ácido glutámico, valina y leucina.

El comportamiento químico del pelo se puede explicar en términos de enlaces de hidrógeno, uniones salinas y enlaces cruzados. La presencia de queratina se ha demostrado por estudios de rayos X.

La superficie cuticular del pelo humano ha recibido escasa atención, a pesar de su importancia en lo que se relaciona con la formulación y comportamiento de las preparaciones capilares. (16, 26, 39)

La composición química del pelo ha sido causa de curiosidad científica, ya que existe la posibilidad de que los metales presentes puedan ejercer una influencia en la acción de los cosméticos capilares. Dentro de los constituyentes del pelo destacan:

- CARBONO
- HIDROGENO
- NITROGENO
- AZUFRE
- FOSFORO

(16, 39)

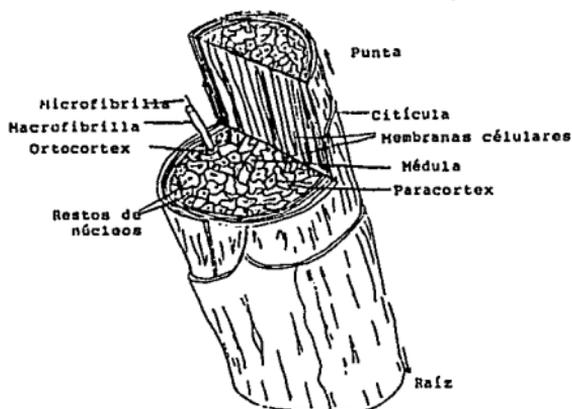


Fig. 2.1 Sección de una fibra del pelo.

2.3. COSMETICOS

El término cosmético es definido por la Asociación Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos hacia 1938 como:

- 1° Artículos que pueden ser untados, vertidos, esparcidos o rociados o de algún otro modo aplicados sobre el cuerpo humano o partes del mismo, (las cuales requieren específica limpieza) para alteración de la apariencia, embellecimiento o incrementar el atractivo.
- 2° Artículos proyectados como componentes y auxiliares de los citados en el primer punto, aclarando que no se incluye a los jabones. (14, 26)

Al hablar de cualquier producto cosmético, se debe tener en cuenta si el mismo contiene aditivos designados para aliviar o mitigar cualquier anomalía en la piel, o hacer cualquier otra cosa que embellezca o proteja la piel; si los contiene este cosmético estará dentro de la clasificación de medicamento o fármaco. (7, 8)

2.3.1 UN PRODUCTO PARA LA HIGIENE CAPILAR: EL CHAMPU

Se define champú como el detergente adecuado para la higiene capilar, envasado de forma cómoda para facilitar su empleo. Con el correr del tiempo se han experimentado cambios en los champús según los requerimientos, transpasando la barrera meramente de limpieza.

El mecanismo de acción detergente de un champú implica varios fenómenos físicos como:

- Humectación
- Espumado
- Emulsificación
- Eliminación
- Brillo

Los tipos de ingredientes para la realización de un champú, se puede clasificar de la siguiente manera :

- Tensoactivos para proporcionar detergencia y espuma
- Tensoactivos auxiliares para mejorar detergencia, espuma y acondicionador de el pelo.
- Aditivos para dar efectos especiales.

2.3.2. SEGURIDAD DE LOS CHAMPUES

El primer champú reconocido como peligroso para los ojos estaba constituido de un detergente no iónico, descrito como dañino para la visión ya que provocó la opalescencia de córnea. La técnica básica de evaluar la seguridad ocular, hasta hace tiempo, era la descrita por Draize, determinando que las concentraciones máximas toleradas son las que no producen lesión alguna en córnea o iris, durante siete días.

Discrepancia en los puntos de vista y en los resultados llevaron a continuar con estudios, ya que el único modo de garantizar la seguridad de una formulación dada de champú es haber ensayado la formulación final, incluyendo antisépticos, perfumes, etc., con relación a la irritación córnea por instalación en el ojo de animales.

La mayor parte de los champúes resultan irritantes a los ojos, provocando picor y, en ocasiones, inflamación de párpados. En algunos casos los ingredientes desempeñan un efecto anestésico sobre los ojos, disfrazando de esta manera la irritación.

Existen diversos reglamentos referentes a materia cosmetológica y los requisitos más específicos para ensayos de irritación primaria de productos de belleza y cosméticos se establecieron con base en las leyes Francesas de Cosméticos de 1971, modificadas en 1973.

Aquí se incluyen resultados en la piel intacta y escarificada para determinar irritación.
(7, 8, 29)

2.4. IRRITACION Y SENSIBILIZACION CUTANEA Y OCULAR

Todo cosmético puede provocar efectos dañinos a la piel siendo lo más frecuente la irritación primaria; se dice que es una serie de cambios químicos y fisiológicos, la alergia se define como la capacidad de reacción adquirida específicamente y alterada frente a un material extraño al organismo. (18, 44)

Los diferentes tipos de alergia se pueden resumir como sigue:

RESPUESTAS INFLAMATORIAS Y ALERGICAS EN LA PIEL POR APLICACION TOPICA DE SUSTANCIAS

Irritación (dermatitis irritante)
a) Irritación aguda o primaria
b) Irritación por exposición repetida o secundaria

Urticaria de contacto

Una respuesta admetosa transitoria mediada por intermediarios farmacológicos secretados por liberación de las terminaciones nerviosas sensoriales.

Picor

Una sensación transitoria diferente de la irritación y de la alergia, pero considerándose una irritación de las terminaciones nerviosas sensoriales.

Urticaria alérgica

Inducida por el antígeno de la sustancia aplicada, reacciona con anticuerpos específicos, origina la liberación de mediadores farmacológicos.

Dermatitis alérgica de contacto (eczema de contacto)
Dermatitis fototóxica
Dermatitis fotoalérgica

En cuanto a irritación ocular, es sabido que el ojo es uno de los órganos sensoriales más valiosos y vulnerables; consecuentemente, la evaluación total de las propiedades toxicológicas de los químicos han incluido la determinación de su potencial para dañar el tejido ocular después de haber tenido un contacto directo. (30, 32)

2.4.1. PRUEBAS PARA PREDECIR LA IRRITACION DERMICA Y OCULAR

Las pruebas de irritación son una parte primordial para evaluar la seguridad en el uso de productos y sustancias en los humanos.

Los tensoactivos son un tipo de agentes que aparecen en numerosas formulaciones, tanto de cosméticos como de artículos de consumo. Su naturaleza química los hace poseer una gran afinidad para reaccionar con las membranas celulares y afectar las unidades funcionales y estructurales proteicas. Por eso, para estudiar los efectos citotóxicos de los tensoactivos, se requieren métodos específicos en los que la citolisis constituye el factor determinante. El efecto más importante de los surfactantes sobre los organismos depende de la interacción de los agentes activos de superficie, que están constituidos por la parte hidrofílica, la hidrofóbica y las estructuras ordenadas que estabilizan la interfase entre la parte polar y las no polares. (23)

Las biomembranas están constituidas por glicero-fosfolípidos y proteínas con una superficie hidrofílica y un núcleo hidrofóbico.

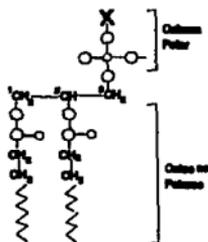


Fig. 2.2.
Estructura básica
de un fosfolípido.

Los tensoactivos en bajas concentraciones interactúan con las unidades estructurales similares de las membranas. Cantidades mayores de surfactantes especiales lisan o desintegran su estructura, solubilizando las moléculas más o menos insolubles en agua de las membranas citoplásmicas como los fosfolípidos y las proteínas intrínsecas.

Las proteínas se desnaturalizan dependiendo de una determinada concentración, formando micelas que existen en equilibrio con sus monómeros. El aumento posterior de las concentraciones se ve reflejado en la permeabilidad de la membrana para las moléculas pequeñas y llevan a la solubilización de los componentes de la membrana.

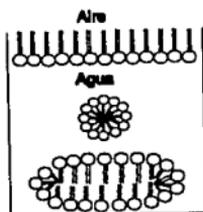


Fig. 2.3. Sistema de micelas

(9, 22)

Bajo estos antecedentes, la prueba de Draize ha sido utilizada por los toxicólogos para evaluar el potencial de los químicos de dañar el ojo humano.

Con modificaciones ligeras, este ensayo se usa frecuentemente para detectar irritantes primarios e hipersensibilidad retardada.

Existen otros ensayos para determinar la seguridad de la sustancia o producto como pruebas epicutáneas, ensayos de parche, ensayos de inmersión del brazo y ensayos de simulación en uso.

La ejecución apropiada de los ensayos predictivos y la consideración cuidadosa en el uso de sustancias se han hecho para garantizar que toda preparación cosmética sea segura en uso para millones de personas. (14, 29, 44)

" La mejor prueba de un producto se apoya en el uso diario ".

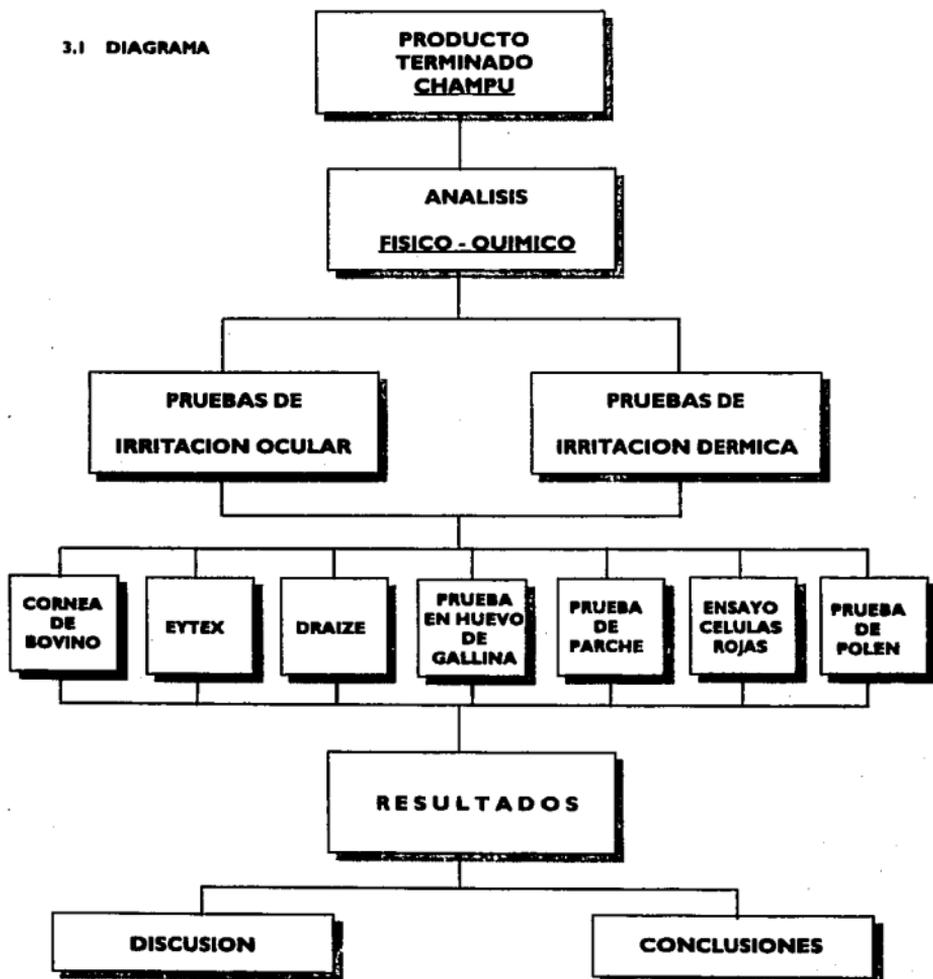
Goodman

CAPITULO

III.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA



3.2. MATERIALES, REACTIVOS Y APARATOS

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Conejos albinos
- Córnea de bovino
- Huevo de gallina fértil
- Eritrocitos
- Matriz macromolecular
- Polen de tabaco

3.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Algodón
- Baño de agua Tolhurst T-1300 con cubierta plástica
- Bisturf
- Centrífuga Heraeus 20 - E40
- Cinta microporo
- Dosificador manual con puntillas de capacidad .1ml, .2ml.
- Incubadora aut. Muller 316 LRA-0
- Espectrofotómetro, Beckman DU-2
- Frascos para reactivos ámbar y blanco.
- Frascos de polietileno
- Gasas estériles
- Microscopio de alta resolución B & L 3700 TX.
- Potenciómetro B & L.
- Sierra rotatoria
- Tubos de vidrio

3.2.3. REACTIVOS

- Acetona
- Agua destilada
- Diluyente estándar Microbics Co.
- Diluyente plus
- Etanol 96°
- Fluoresceína sódica
- Muestras de producto terminado
 - a) Champú para cabello normal: Lab. BDF**** de México.
 - b) Champú acondicionador: Lab. BDF**** de México.
 - c) Champú para bebé Lab. Johnson & Johnson S.A de C.V.
 - d) Champú medicinal Lab. Janssen Farmacéutica S.A de C.V.
- Sílicon Gibco
- Solución amortiguadora No 7 Orion Research Inc.
- Solución amortiguadora de citratos
- Solución para lavado de electrodos Microbics Co.
- Solución reconstituyente Mic. Co.
- Solución salina (isotónica)
- Tolueno

3.3. METODOLOGIA

Debido a que el enfoque de este trabajo es hacia las pruebas para la determinación de irritación dérmica y ocular a causa del uso de cosméticos de higiene capilar, el producto terminado se sometió a los análisis físico-químicos correspondientes.

Si se cumple con los requerimientos estipulados en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos y con los reglamentos de la industria cosmética, se procede a realizar

las pruebas de irritación.

PRUEBA DE DRAIZE

Depositar 0.1 ml del champú en estudio en el ojo izquierdo de cada uno de los 3 conejos albinos utilizados para cada tipo de champú trabajado. El ojo derecho se deja como control; transcurridos 4 segundos de contacto se lavan ambos ojos con 30 ml de solución fisiológica para observar algún síntoma patológico.

Las observaciones se repiten a las 24 horas, 48 horas y así de manera sucesiva hasta 168 horas (7 días).

Las lesiones se evalúan a nivel córnea, iris y conjuntiva.

PRUEBA EN CORNEA DE BOVINO

La prueba se realiza con ocho ojos de bovinos los cuales se extraen bajo condiciones estandar (Apéndice 7.1). Las córneas se examinan y aprueban, manteniéndose en solución salina aproximadamente 4 horas a 20 °C; después de la extracción se da inicio a la prueba, tomando tres de las ocho córneas como controles, que se colocan en ambiente propicio (Apéndice No. 7.2).

Sobre la córnea preparada (Apéndice N° 7.3), se deposita 0.1 ml de la sustancia de prueba y en los controles, uno con tolueno, otro con acetona, y un último testigo sin sustancia. Pasados 30 seg. se enjuagan las córneas con 10 ml de solución salina para proceder a incubar en baño de agua por 10 min.

Se evalúa la opacidad presentada y se aplica fluoresceína sódica (Apéndice N° 7.4), para determinar la integridad del epitelio córneo. Los resultados finales se toman a partir de la marca final obtenida de cada uno de los ojos.

PRUEBA DE HUEVO DE GALLINA FERTIL
(MEMBRANA CORIONALANTOICA) (CAM)

En este ensayo se manejan huevos fértiles de gallinas blancas Lohman del tipo Leghorn, con un peso de entre 50 y 60 g. por huevo.

Los huevos se dejan por un período de 10 días en incubadora de charola de rotación automática, a una temperatura de $37.5 \pm 7.5\%$ °C, con una humedad relativa de $62.5 \pm 7.5\%$. Los huevos se proveen de calor para controlar la gestación y al décimo día por su extremo más ancho, se abren, usando una sierra de dentista.

La membrana interior del huevo se humedece con una solución isotónica para facilitar su eliminación; la membrana corionalantoica vasculada está lista para la aplicación de 0.3 ml de solución de prueba. Por medio de un estereo-microscopio se observa la reacción, se registran tiempos de lisis vascular, hemorragias y coagulación (Apéndice N° 7.5), ésto con el fin de proceder a la evaluación de los datos.

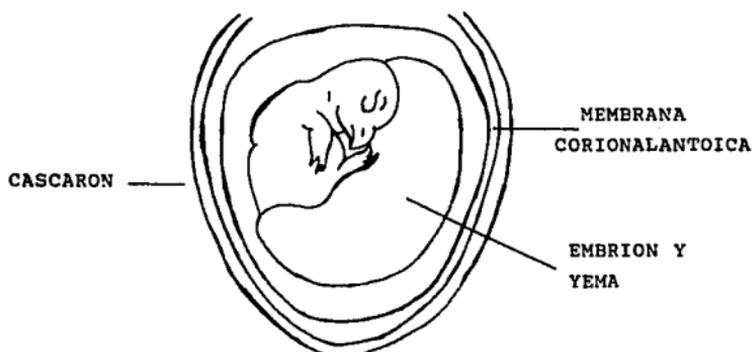


Fig. 3.3.1 Localización de la membrana Corionalantoica

PRUEBA SOBRE CELULAS ROJAS SANGUINEAS (RBC)

Para la realización de este ensayo se emplean eritrocitos previamente tratados (Apéndice N° 7.6), se recolectan en frascos de polietileno con 50 ml de solución amortiguadora de citrato (Apéndice N° 7.7), y 450 ml de la muestra de sangre para lograr una concentración 1:10 citrato:sangre.

Las muestras se mantienen 30 min. en cajas precalentadas a 21-22 °C, se centrifugan a 1500 X por min. para de esta manera eliminar el plasma de la superficie por succión y el paquete se lava con solución salina de fosfato amortiguador para eliminar rastros tanto de células blancas como de plasma. Las células rojas se mantienen a 4 °C hasta su uso, empleando 200×10^6 células por cada mililitro de muestra.

Se preparan ocho concentraciones de muestras, para determinar el valor DL_{50} que relaciona respuesta a la concentración.

PRUEBA DE PARCHES

Es una prueba biológica destinada a detectar la presencia o ausencia de hipersensibilidad de tipo retardado frente a un alérgeno de contacto específico.

Para la prueba se emplearon 20 conejos albinos, elegidos por su fácil manejo. Los animales fueron rasurados en el lomo y del total, 10 fueron empleados como testigos. Se usaron discos (Apéndice N° 7.8), en las siguientes posiciones:

$$\begin{pmatrix} A & C \\ D & B \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C & A \\ B & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B & A \\ C & D \end{pmatrix}$$

$$\begin{pmatrix} C & B \\ D & A \end{pmatrix} \begin{pmatrix} D & B \\ C & A \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B & D \\ A & C \end{pmatrix}$$

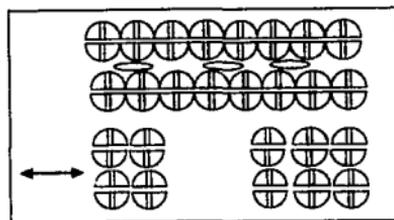
Se colocó en cada parche 0.25 ml de material a prueba y se fijaron con cinta microporo, en el caso de los testigos se utilizó agua destilada. Los animales fueron sometidos a una caja que permite su inmovilidad para colocar específicamente los parches. Las revisiones se efectuaron a las 24 horas, 48 horas y 72 horas, posteriores a su colocación.

Para identificar los resultados, se usó la siguiente tabla:

N P	=	No Probado
-	=	Reacción negativa
± ó ?	=	Reacción dudosa (mínimo eritema)
+	=	Reacción palpable débil
++	=	Reacción intensa (vesícula edema)
+++	=	Reacción grave (ampolla)
R I	=	Reacción irritativa

PRUEBA EYTEX

La finalidad de los métodos biomacromoleculares para evaluar los efectos de formulaciones químicas sobre la función y estructura de las biomacromoléculas, es predecir la respuesta tóxica In-Vivo. En este método, se utiliza una matriz biomacromolecular para simular el tejido de la córnea en la prueba. Esta matriz está compuesta por filamentos protéicos de alta organización con espacios regulares, por lo que su apariencia es clara. Esta matriz se expone al compuesto químico, ante la presencia de este último se puede presentar desde una ligera opacidad hasta una densa turbidez, lo cual se mide por espectrofotometría.



Ordenación
macromolecular
de la matriz

Fig. 3.3.2.

PRUEBA DE POLEN

Se preparó una solución en un medio de cultivo con polen de tabaco (*Nicotina sylvestris*), y 0.1 ml. de sustancia de prueba, se procedió a la incubación paralelamente con un testigo por un término de 18 horas en los tubos. Al final de la incubación las muestras fueron teñidas con azul alcian y acidificadas con ácido cítrico para redissolver el tinte absorbido. Se determinó la concentración de azul alcian fotométricamente a 420 nm, para comprobar que todo había sido absorbido. La inhibición del crecimiento del polen, se observó en el microscopio de alta resolución.



Fig. 3.3.3.
Granos de Polen de Tabaco

CAPITULO

IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

Las muestras del producto fueron trabajadas en el siguiente orden:

- Champú para cabello normal
- Champú acondicionador
- Champú para bebé
- Champú medicinal

4.1.1. PRUEBA DRAIZE

El primer ensayo a realizar fue la prueba de Draize; esta se realizó bajo la metodología anteriormente citada; para cada tipo de producto a probar, se emplearon tres conejos de sepa Nueva Zelanda bajo condiciones estándar, en la primera observación a los 4 segundos de aplicada la muestra, se identificó claramente la irritación provocada por el champú medicinal y por el champú acondicionador. Las pruebas arrojaron los datos que aparecen en las tablas correspondientes.

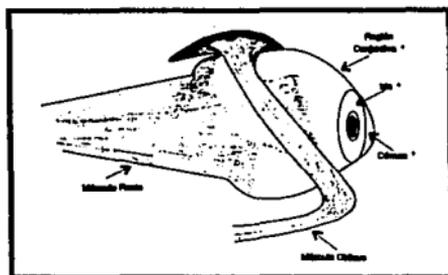


Fig. 4.1.1.

* Áreas a Evaluar

**PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE
CHAMPU PARA CABELLO NORMAL**

CONEJO			TIEMPO DE OBS.	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO		CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
1	2.840 g.	♂		A	B	C	A	B	A	
			24 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			48 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			72 hrs.	0	0	0	1	1	0	
			4° día	0	0	0	1	1	0	
			5° día	0	0	0	1	1	0	
			6° día	0	0	0	1	1	0	
			7° día	0	0	0	1	1	0	
2	2.500 g.	♂	24 hrs.	1	0	1	1	1	0	
			48 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			72 hrs.	0	0	0	1	1	0	
			4° día	0	0	0	1	1	0	
			5° día	0	0	0	1	1	0	
			6° día	0	0	0	0	0	0	
			7° día	0	0	0	0	0	0	

NOTA.- La prueba fue realizada con tres conejos de cepa Nueva Zelanda, en cada caso.

**PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE
CHAMPU PARA CABELLO NORMAL**

(CONTINUACION)

CONEJO			TIEMPO DE OBS.	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO		CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
				A	B	C	A	B	A	
3	2.630 g.	♂	24 hrs.	2	0	0	1	1	0	
			48 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			72 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			4° día	1	0	0	1	1	0	
			5° día	1	0	0	1	1	0	
			6° día	1	0	0	1	1	0	
			7° día	1	0	0	1	1	0	
$40.98 \div 7 =$ <u>5.85</u> $5.85 \div 110 =$ <u>0.053</u> Este producto es NO irritante de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM - 347										

TABLA 4.1.1. - 1

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU ACONDICIONADOR

CONEJO			TIEMPO DE OBS.	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO		CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
1	2.710 g.	♂	24 hrs.	A	B	C	A	B	A	
			48 hrs.	1	1	0	1	2	0	
			72 hrs.	1	0	1	1	1	0	
			4° día	1	0	0	1	1	0	
			5° día	1	0	0	1	1	0	
			6° día	1	0	0	1	1	0	
			7° día	1	0	0	1	1	0	
2	2.500 g.	♂	24 hrs.	1	0	1	1	1	0	
			48 hrs.	1	0	1	1	1	0	
			72 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			4° día	1	0	0	1	1	0	
			5° día	0	0	0	1	1	0	
			6° día	0	0	0	1	1	0	
			7° día	0	0	0	1	1	0	

TABLA 4.1.1. - 2

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU ACONDICIONADOR

(CONTINUACION)

CONEJO			TIEMPO	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO	DE OBS.	CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
				A	B	C	A	B	A	
3	2.814 g.	♂	24 hrs.	1	1	0	1	1	0	
			48 hrs.	1	1	0	1	1	0	
			72 hrs.	1	0	0	1	1	0	
			4° día	1	0	0	1	1	0	
			5° día	1	0	0	1	1	0	
			6° día	1	0	0	1	1	0	
			7° día	1	0	0	1	1	0	
52.53 ÷ 7 = <u>7.50</u> 7.50 ÷ 110 = <u>0.068</u> Este producto es NO irritante de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM - 347										

TABLA 4.1.1 - 2

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU PARA BEBE

CONEJO			TIEMPO DE OBS.	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO		CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
1	2.670 g.	♂	24 hrs.	1	1	0	0	0	1	
			48 hrs.	0	0	1	0	0	1	
			72 hrs.	0	0	0	0	0	0	
			4° día	A partir del 4° día no se observan alteraciones						
2	2.800 g.	♂	24 hrs.	1	1	0	1	1	0	
			48 hrs.	0	0	0	0	0	0	
			72 hrs.	0	0	0	1	0	0	
			A partir del 4° día no se observan alteraciones							
 										

TABLA 4.1.1. - 3

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU PARA BEBE

(CONTINUACION)

CONEJO			TIEMPO	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO	DE OBS.	CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
				A	B	C	A	B	A	
3	2.710 g	♂	24 hrs.	1	1	1	0	1	1	18.2 → 3 =
			48 hrs.	0	0	1	0	0	0	6.06
			72 hrs.	0	1	0	0	0	0	6.06 → 110 =
			4° día	A partir del 4° día no se observan alteraciones						0
Este producto es NO irritante de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana: NOM - 347										

TABLA 4.1.1.- 3

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU MEDICINAL

CONEJO			TIEMPO DE OBS.	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO		CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
1	2.840 g.	♂	24 hrs.	1	1	1	1	1	1	1
			48 hrs.	1	0	1	1	1	1	1
			72 hrs.	1	1	0	1	1	1	1
			4° día	1	1	0	1	1	0	0
			5° día	1	0	0	1	1	0	0
			6° día	1	0	0	1	1	0	0
			7° día	1	0	0	1	1	0	0
2	2.908 g.	♂	24 hrs.	1	1	0	1	1	1	1
			48 hrs.	1	1	1	1	1	0	0
			72 hrs.	1	1	0	1	1	1	1
			4° día	1	0	1	1	1	1	1
			5° día	1	0	0	1	1	0	0
			6° día	1	0	0	1	1	0	0
			7° día	1	0	0	1	1	0	0

TABLA 4.1.1. - 4

PRUEBA DE IRRITABILIDAD DRAIZE

CHAMPU MEDICINAL

(CONTINUACION)

CONEJO			TIEMPO	VALORACION EN AREA :						CALCULOS
N°	PESO	SEXO	DE OBS.	CONJUNTIVA			CORNEA		IRIS	
				A	B	C	A	B	A	
3	2.875 g.	♂	24 hrs.	1	1	1	1	1	1	78.95 ÷ 7 =
			48 hrs.	1	0	1	1	1	1	11.27
			72 hrs.	1	0	1	1	1	1	11.27 ÷ 110 =
			4° día	1	1	0	1	1	1	<u>0.10</u>
			5° día	1	0	0	1	1	1	
			6° día	1	0	0	1	1	0	
			7° día	1	0	0	1	1	0	
<p>Este producto contiene ingredientes que pueden ocasionar la aparición de irritación, por lo que se recomienda, en caso de presentarse, discontinuar su uso.</p>									NOM - 347	

TABLA 4.1.1. - 4

4.1.2. ENSAYO EN CORNEA DE BOVINO

Referente al ensayo practicado en córnea de bovino, las observaciones se realizaron a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de aplicada la muestra problema y los resultados fueron interpretados en base a la tabla 4.1.2. - 1, obteniendo como resultado final los datos presentados en la tabla 4.1.2. - 2. Durante el desarrollo de este ensayo se emplearon dos sustancias químicas que son acetona y tolueno, cuyo índice de irritación es conocido con anterioridad, por lo que estas sustancias desempeñan un papel de controles en este ensayo.

**TABLA GENERAL DE INDICE DE IRRITACION
ENSAYO EN CORNEA DE BOVINO**

INDICE DE IRRITACION	INTERPRETACION
≤ 0.5	NO irritante
0.6 - 1.9	Ligera irritación
2.0 - 4.0	Moderada irritación
≥ 4.0	Severa irritación

Tabla 4.1.2. - 1

PRUEBA DE IRRITABILIDAD EN CORNEA DE BOVINO

COMPUESTO	CLASIFICACION
Tolueno	Ligeramente irritante
Acetona	Moderadamente irritante
Champú para cabello normal	No irritante
Champú acondicionador	No irritante
Champú para bebé	No irritante
Champú medicinal	Ligeramente irritante
Testigo	NO irritante
Control (Champú acondicionador)	NO irritante

Tabla 4.1.2. - 2

4.1.3. PRUEBA EN HUEVO DE GALLINA FERTIL MEMBRANA CORIONALANTOICA (CAM)

En la presente prueba, bajo la observación de un microscopio para mayor amplificación, se detectan los índices de irritación dentro de los 5 min. posteriores a depositar la muestra como se cita en la metodología.

Los datos se evaluaron por el método de tiempo de reacción; esto es el tiempo de la primera aparición de las diferentes reacciones, el cual fué registrado para calcular el potencial de irritación de la siguiente manera:

$$\text{Índice de irritación} = \left\{ \begin{array}{l} [5.(301 \text{ Hemorragias}) \\ + 7.(301 \text{ Lisis}) \\ + 9.(301 \text{ Coagulación})] \div 300 \end{array} \right.$$

El índice máximo de irritación :

$$5 + 7 + 9 = 21$$

Si las reacciones se observan inmediatamente después de aplicar la muestra y esperar 300 seg. se define la clasificación que aparece en la tabla 4.1.3. - 1.

Los resultados obtenidos en este ensayo se aprecian en la tabla 4.1.3. - 3.

Cabe mencionar que en esta prueba también se emplearon como testigos control, acetona y tolueno, para poder preestablecer una correlación entre el ensayo de córnea de bovino y la prueba de membrana corionalantoica.

Los valores obtenidos en la primera tabla obedecen a los datos que proporciona la tabla 4.1.3. - 2.

**CLASIFICACION PARA EL ENSAYO
EN HUEVO DE GALLINA FERTIL**

INDICE DE IRRITACION	CLASIFICACION
0.0 - 0.9	NO IRRITANTE
1.0 - 4.9	LIGERAMENTE IRRITANTE
5.0 - 8.9	MODERADAMENTE IRRITANTE
9.0 - 21.0	FUERTEMENTE IRRITANTE

Tabla 4.1.3. - 1

**RESULTADO DEL ENSAYO EN
MEMBRANA CORIONALANTOICA**

EFECTO	* INTERVALO DE OBSERVACION		
	0.5 min.	2 min.	5 min.
Inyección	2	1.5	0.5
Hemorragia	3	2	1
Coagulación	6	3	0.5

Tabla 4.1.3. - 2

* MINUTOS DESPUES DE HABER SIDO TRATADO EL HUEVO

**INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS
EN MEMBRANA CORNEAL ANTORICA**

COMPUESTO	INTERPRETACION
Acetona	Ligeramente irritante
Tolueno	Ligeramente irritante
Champú para cabello normal	NO irritante
Champú acondicionador	NO irritante
Champú para bebé	NO irritante
Champú medicinal	Ligeramente irritante
Testigo control	NO irritante

Table 4.1.3. - 3

4.1.4. ENSAYO DE CELULAS ROJAS (RBC)

En total fueron requeridas 5 mil millones de células rojas (RBC) por cada muestra problema a una concentración de 0.125 mmol oxihemoglobina / l y 3.5 mmol sustancia de prueba / l.

La liberación de hemoglobina causada por la hemólisis a bajas concentraciones de la sustancia problema, se sobrepone con el inicio de la desnaturalización de la hemoglobina.

El índice de desnaturalización (ID) de 100% se detectó a una concentración de 3.47 mmol/l de sustancia problema.

Las células rojas contenidas en un mililitro de sangre original se usan para determinar el potencial de irritación de los surfactantes sobre la piel y las membranas mucosas; ambos puntos corresponden a daños a la membrana y a la proteína y se pueden relacionar con los daños producidos sobre la conjuntiva, el iris y la córnea de ojo.

Los cambios en el comportamiento óptico de la oxihemoglobina se usan como indicador para monitorear ambos puntos.

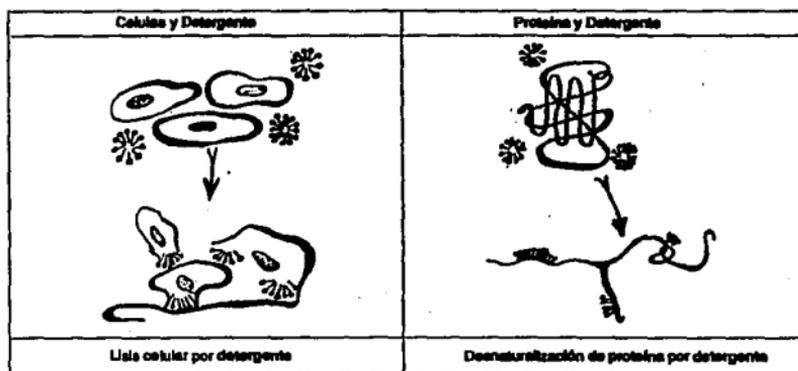


Fig. 4.1.4. - 1

**VALORES PARA LOS RESULTADOS
DEL ENSAYO EN CELULAS ROJAS**

COMPUESTO	H ₅₀	I D	CLASIFICACION
Testigo control	(ppm) No lisis	% 1	No irritante
Champú para cabello normal	No lisis	1	No irritante
Champú acondicionador	> 500	1	No irritante
Champú para bebé	No lisis	1	No irritante
Champú medicinal	32	79	Ligeramente irritante

Table 4.1.4. - 2

4.1.5. PRUEBA DE PARCHE

La naturaleza química de las sustancias puede ser un punto de ayuda en estas pruebas.

La dificultad más grande al leer las pruebas epicutáneas es distinguir entre unas pruebas alérgicas y otras no alérgicas.

Con frecuencia este problema se presenta con sustancias o formulaciones nuevas en las cuales algún componente no tiene datos de referencia; en estos casos, lo mejor es repetir la prueba ya que se puede tratar de alguna reacción "falso positivo".

Los resultados fueron obtenidos en base a la siguiente escala.

Escala de valoración para irritación dérmica	
VALOR	TIPO DE REACCION
0	No reacción
1	Ligero eritema
2	Moderado eritema
3	Severo eritema

Cuadro 4.1.5 - 1

Las lecturas se realizan a las dos horas de haber colocado la muestra problema, 24 horas, 48 horas, y 72 horas.

Únicamente en el caso de que aparezca lesión y perdure hasta las 72 horas se extiende el periodo de observación.

**VALORES PARA LOS RESULTADOS
DEL ENSAYO EN PRUEBA DE PARCHES**

COMPUESTO	24 H.	48 H.	72 H.	INTERPRETACION	
Testigo control	0	0	0	No irritante	(-)
Champú para cabello normal	1	0	0	No irritante	(-)
Champú acondicionador	0	0	0	No irritante	(-)
Champú para bebé	0	0	0	No irritante	(-)
Champú medicinal	1	1	0	Reacción ligera	(±)

Tabla 4.1.5. - 1

4.1.6. PRUEBA EYTEX

El grado de opacidad registrado por el método Eytex se cuantificó mediante la densidad óptica (D.O.) a 400 nm; el potencial de irritación de las muestras se evaluó aplicando los valores establecidos en la tabla de referencia. Se empleó una muestra de acetona para tener un doble testigo.

DENSIDAD OPTICA x 10 ⁵	INTERPRETACION
0 - 200	NO IRRITANTE
201 - 700	LIGERA IRRITACION
701 - 1800	IRRITACION MODERADA
1801 - en adelante	IRRITACION SEVERA

Tabla 4.1.6. - 1

INTERPRETACION PARA LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA EYTEX

COMPUESTO	VALOR	INTERPRETACION
Acetona	330	LIGERAMENTE IRRITANTE
Champú para cabello normal	189	NO IRRITANTE
Champú acondicionador	190	NO IRRITANTE
Champú para bebé	186	NO IRRITANTE
Champú medicinal	430	LIGERAMENTE IRRITANTE
Testigo	180	NO IRRITANTE

Tabla 4.1.6. - 2

4.1.7. CRECIMIENTO EN TUBOS DE POLEN

El tubo de polen de *Nicotina sylvestris* que está en rápido crecimiento es muy sensible a influencias ambientales y tóxicas. En nuestro estudio, hemos probado varias soluciones surfactantes. Se demuestra la inhibición de crecimiento inducida por concentraciones crecientes del material de prueba. Dosis efectivas del 50% de inhibición de crecimiento (DE_{50}) se aplican para caracterizar la interacción entre los tubos de polen incubados y el material de prueba. Para estudiar los efectos de distintas soluciones surfactantes y la formulación cosmética final en la inhibición de crecimiento, hemos comparado los rangos de valores de DE_{50} con potenciales de irritación de estos materiales evaluados por pruebas Draize de irritación de los ojos y la piel.

Concluimos que hasta cierto punto, por medio de la prueba de crecimiento en tubo de polen, se pueden pronosticar los efectos dañinos de ingredientes que inducen a la irritación de ojos. En la mayoría de los casos, los productos no irritantes necesitan altas concentraciones para inhibir el crecimiento de tubos de polen. Para examinar la irritación de la piel, se llevó a cabo un segundo estudio. Los datos del procedimiento de prueba de parche oclusivo mantenido por 24 horas (los resultados acumulativos medios fueron leídos después de 24, 48 y 72 horas) se han comparado con los valores de DE_{50} de algunos productos terminados.

Los tensoactivos severos y fuertemente irritantes revelan valores DE_{50} bajos, mientras que algunas sustancias ligeramente y no irritantes necesitaban concentraciones altas de materiales de prueba para inhibir el crecimiento a 50%.

**INTERPRETACION DE RESULTADOS PARA EL ENSAYO DE
CRECIMIENTO EN TUBOS DE POLEN**

MUESTRA PROBLEMA	OBSERVACION	INTERPRETACION
Champú para cabello normal	No inhibición	No irritante
Champú acondicionador	No inhibición	No irritante
Champú para bebé	No inhibición	No irritante
Champú medicinal	Ligera inhibición	Ligeramente irritante
Testigo control	No inhibición	No irritante

Tabla 4.1.7. - 1

4.2.

DISCUSION

Los ensayos descritos en el presente trabajo, fueron empleados para obtener una correlación entre los métodos In-vivo y los métodos In-vitro referente al potencial de irritación.

El principal equivalente se aprecia en los resultados arrojados por las tablas de observaciones coincidiendo de manera satisfactoria. Las pruebas actúan a diferentes niveles donde el producto higiénico capilar podría interactuar, como se aprecia en la tabla 4.2.1.

El uso de modelos inapropiados para probar un producto podría llevarnos a falsas respuestas de irritación en las pruebas In-vitro. Cada tipo de cosmético deberá ser probado en ensayos adecuados, dependiendo de la zona de aplicación.

Los métodos aquí presentados ofrecen material de fácil acceso económico, que permite la disminución del uso de animales.

La repetitividad de las pruebas y sus constantes resultados no ponen en duda la confiabilidad que ofrecen los presentes ensayos.

Cabe mencionar que es importante el tamaño de grupo de prueba y la longitud del periodo de observación para evaluar el riesgo, ya que con esto se ve incrementado el número de material biológico y en algunos casos, como lo es en la prueba de Draize, esto sería una cuantiosa afección.

En cuanto al pronóstico potencial de irritación del ojo, la prueba de crecimiento en tubos de polen fue una de las alternativas más confiables *in-vitro*. En particular, este es el caso con productos basados en surfactantes. Así, proponemos la Prueba de Crecimiento en Tubos de Polen como una prueba en la serie de pruebas *in-vitro* para la evaluación potencial de irritación de preparaciones cosméticas de aplicación tópica.

.Si a todo lo anteriormente citado, le agregamos la serie de críticas que fueron hechas ha la prueba de Draize, y la notable superación de las mismas en ayuda para la protección de animales, se puede aventurar la utilización de las alternativas aquí planteadas.

**MECANISMOS DE VALORACION
DE DIVERSOS ENSAYOS**

ENSAYO	MECANISMO DE VALORACION
Prueba de Draize	Celulas humanas dañadas
Prueba en cornea de bovino	Opacidad de tejido. Celulas dañadas
Prueba en la membrana corionantoica (CAM)	Cambio morfológico. Tejido dañado
Prueba en celulas rojas	Permeabilidad celular. Muerte de células
Prueba de parche	Síntesis de proteínas
	Cambio confirmado. Proteína sintética

Tabla 4.2.1.

CAPITULO

V

5.1

CONCLUSIONES

- Se realizaron las pruebas In-vitro: Córnea de bovino, eytex, prueba en huevo de gallina fértil, ensayo en células rojas y prueba de polen para evaluarlas contras las pruebas In-vivo: Draize y Prueba de parche.
 - Se muestra claramente que los ensayos In-vitro presentados como alternativas, son de aplicación práctica, lo cual les da carácter accesible; si a esto le agregamos el bajo costo que reporta su elaboración y los resultados confiables y reproducibles para evaluar los efectos destructores de los tensoactivos sobre las células, aparecen más atractivos que la prueba de Draize.
 - Las pruebas alternas presentadas son particularmente prometedoras para validaciones legales.
 - El constante e innovador desarrollo de ensayos In-vitro, como se puede contemplar en este trabajo, no reemplazará completamente el uso de animales en las pruebas para seguridad dérmica y ocular, pero sí proporciona una significativa e importante reducción en el número de animales así como técnicas menos drásticas y menos dolorosas si se compara con los métodos In-vivo.
- Se espera que con la presente información y la incorporación de las alternativas In-vitro, se generen nuevos programas que cumplan con la tarea de desarrollar nuevas y mejores alternativas In-vitro, para determinar la irritación dérmica y ocular ocasionada por los productos para la higiene capilar: "Los champúes".
- La prueba de Crecimiento en Tubo del Polen (prueba PTG), para detectar la citotoxicidad de químicos bioactivos, se compara con la prueba Draize. La prueba PTG se basa en la reacción del crecimiento de tubos del polen de tabaco. Una

comparación de datos en ambos ensayos revelan correlaciones altamente significativas, mientras que los tensoactivos no iónicos, demuestran efectos moderados.

Los resultados de la comparación demuestran que la prueba PTG se adapta muy bien para eliminar potenciales irritantes de surfactantes y productos de cosméticos basados en surfactantes. Proporciona resultados reproducibles de bajo costo y ayuda a reducir o hasta eliminar pruebas dolorosas en que se usan animales.

- El objetivo se ve cubierto, ya que cualquier programa de pruebas alternas In-vitro debe contar con el desarrollo de ensayos que puedan proveer de datos valiosos sobre la seguridad de ingredientes químicos o combinaciones de los mismos, como lo son las formulaciones, para el usuario.
- Todo lo anteriormente concluído, aunado con los resultados, nos permite aventurar la sustitución de la prueba de Draize o al menos disminuir el número de las mismas, por lo que se considera que se cumplió con el objetivo planteado.

CAPITULO
VI

6.1.

BIBLIOGRAFIA

1. Allured Stanley, **ANIMAL TESTING SERVED IT'S PURPOSE.**
Cosmetics and Toiletries. Vol. 107, 1992
2. Alvarado H. V., **PRUEBA DE IRRITABILIDAD.**
Laboratorio de control analítico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.,
México, D.F., 1987
3. Basom M. Howard, Malbach, MD. **IN VITRO SKIN IRRITATION - ASSAYS -
CURRENT STATUS.**
University of California, 1992
4. Borendfreund, E. and Borrero. **IN VITRO CYTOTOXICITY ASSAY.**
Potential alternatives to the Draize ocular irritancy test.
Biol. Toxicol. 1:33-39, 1984
5. Brave E. H., Wade J. V. **IN VIVO ASSESSMENT OF SKIN.**
Institute of Chemical Defense, J. Soc. Cosmet. Cehm. No. 41, Vol. 5, New York, NY,
1990
6. Casterjón, Abadía, Couriel. **PRACTICAS CORRECTAS DE MANUFACTURA EN LA
INDUSTRIA FARMACEUTICA.** Asociación Farmacéutica Mexicana.
7. Cottington, Kissinger and Tolgyesi, J. **OCULAR AND SKIN DAMAGE.**
Soc. Cosmet. Cehm. New York, NY, 1977
8. Diario Oficial, **PRODUCTOS DE PERFUMERIA Y BELLEZA.**
México, D.F., 1988

9. Draize J. H. Woodard. **METHODS FOR THE STUDY OF IRRITATION AND TOXICITY OF SUBSTANCES APPLIED TOPICALLY TO THE SKIN.**
F.D.A. Washington, D.C., 1944
10. Dudley - Yutza, Anderson. **CONSUMER ATTITUDES ON THE USE OF LABORATORY ANIMAL FOR SAFETY TESTING OF PERSONAL CARE PRODUCTS.**
Princeton, NJ, 1988
11. Eigener V. **MICROBIOLOGIE COSMED/PHARMA.**
BDF*** AG. Hamburg, 1989
12. Fraizer J.M. Gad, Meyer. **A CRITICAL EVALUATION OF ALTERNATIVES TEST.**
J. Toxicol. Vol2, 1987
13. Gettings D. PhD. **UPDATE ON IN VITRO ALTERNATIVES DEVELOPMENT.**
C.T.F.A., Washington, D.C., Vol 107-11, 1992
14. Gibson W. T., Teall M. R. **INTERACTIONS OF SURFACTANTS WITH THE SKIN.**
Food Chem. Toxicol. Vol. 210-5, New York, 1983
15. Goldberg, W. **ALTERNATIVE METHODS IN TOXICOLOGY.**
J. Toxicol., Vol. 4-3, New York, 1981
16. Goodman H. Dr. **OUR HAIR.**
B.V. ed. New York, 1979
17. Harris K. Palmer E. Dr. **EYTEX AND SKINTEX, LEADING OCULAR AND DERMAL TOXICITY TEST IN VITRO.**
Ed. Internacional, México, D.F.

18. Hirschhorn R. **THE INFLAMMATION PROCESS.**
U. Zweifach, ed. Academic press. New York, 1974
19. Hopf G. Dr. **RECOMENDACIONES PARA PRUEBAS DE TOLERANCIA CUTANEA.**
Hamburgo, 1989
20. Jackson, E. M. **CELLULAR AND MOLECULAR EVENTS OF INFLAMMATION.**
J. Toxicol. Ocular, Vol. 3-4, 1984
21. Jackson, E. M. **INDUSTRY SAFETY TESTING PRACTICES.**
Goldber ed. Chapter 5. Vol. 1-5 New York, 1983
22. Jackson, E. M. **OCULAR IRRITANCY IN THE COSMETIC INDUSTRY.**
N. F. Estrim, ed., New York, 1984
23. Jackson, E. M. **IRRITANT CONTACT DERMATITIS.**
Marcel, Inc., New York, 1990
24. Klein Dr. **OCULAR ON-SKIN IRRITATION TEST.**
BDF*** Hamburgo, 1989
25. Lh Bruner, Dj Kam, D. Roberts and Parker. **EVALUATION OF IN VITRO ALTERNATIVES FOR OCULAR SAFETY TESTING.**
Toxicol. Vol. 17, New York, 1991
26. Markland W. R. **ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY.**
Vol. 10 Pag. 769. Norda Briefs, New York, 1978
27. Mc Ewen G. Ph D. **NEW ALTERNATIVES TESTING PROGRAM.**
C.T.F.A. Washington, D.C. 1988

28. Olmedo R. **PRUEBA DE IRRITACION OCULAR.**
Lab. de control especializado Grisi S.A. México, D.F., 1988
29. Prall J. K. **PROCEEDINGS OF THE VIth CONGRESS OF THE INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS.**
Viena 09 1970
30. Prottey C. **THE MOLECULAR BASIS OF IRRITATION.**
Cosmetic Science Vo. 1, Brever, ed. Academic Press, New York, 1978
31. Ritz H. Buehler, E. **DELAYED CONTACT HYPERSENSITIVITY.**
Procter and Gamble Co. New York, 1987.
32. Rook A. **DERMATITIS POR CONTACTO.**
Tratado de dermatología. FMC editor, México, D.F. 1988.
33. Sayre Robert M. **CORRELATION OF In VIVO TESTS**
Allured Publishing Corp. 108 Washington 1993.
34. Sherex Chemical Company, Inc. **LOW IRRITATION SURFACTANTS.**
Dublin Ohio 1990.
35. Schuman R. Zimmerman V. **PERCUTANEOUS ABSORPTION, EYE AND SKIN IRRITATION AND SENSITIZATION.**
Max Von P. Institute, Berlin Germany, 1990.
36. Spielmann, Gerner, Kalwett, Moog. **INTERLABORATORY ASSESSMENT OF ALTERNATIVES TO THE DRAIZE EYE IRRITATION TEST IN GERMANY.**
Toxic In-vitro Vol. 5 Great Britain, 1991.

37. Voss J. Ph.D. **SKIN SENSITIZATION BY MERCAPTANS OF LOW MOLECULAR WEIGHT.**
J. Inv. Dermatology Vol. 31 1958 U.S.A.
38. Weterings and Yvette. **VALIDATION OF THE BECAM ASSAY AN EYE IRRITANCY TEST.**
Toxicol. Research and Consultancy, Netherlands 1989.
39. Wilkinson J.B. Moore R.J. **COSMETOLOGIA DE HARRY.**
Logman Scientific and Technical. 1990.
40. Wolfgang P. **In-Vitro TOXICITY TESTING OF SURFACTANTS AND TENSIOACTIVE COSMETIC PRODUCTS.**
Beiersdorf AG. Hamburgo, 1989.
41. Wolfgang J.P. Hoppe. **In-Vitro METHODS FOR THE ASSESMENT OF PRIMARY LOCAL EFFECTS OF TOPICALLY APPLIED PREPARATIONS.**
Skin Pharmacology. Switzerland 1991.
42. Wolfgang P. Hoppe. **STANDARDIZATION OF AN IN-VITRO RED BLOOD CELL TEST.**
Institute for skin Research. BDF, Hamburg Germany 1990.
43. Wolfgang P.P. Fannenbecker. Hoppe. **VALIDATION OF THE RED BLOOD CELL TEST SYSTEM AS In-Vitro ASSAY FOR THE RAPID SCREENING OF IRRITATION POTENTIAL OF SURFACTANTS.**
Cosmed Division. Hemisphere Publishing co. Hamburg, Germany 1987.
44. Zviar Charles. **CIENCIA DEL CUIDAD DEL CABELLO.**
Hasson Editores S. de R.L. de C.U. México, D.F. 1987.

CAPITULO

VII

A P E N D I C E

7.1. CONDICIONES ESTANDAR DE EXTRACCION Y CONSERVACION.

Los ojos son extraídos del animal dentro de los 10 min. después de su sacrificio. Se recolectan en una solución salina (0.15 M NaCl). Se transportan a una temperatura entre 15 y 20° C. Se examinan a su llegada al laboratorio, para detectar posibles daños causados por su manejo.

7.2. CONDICIONES DE HUMEDAD.

Los ojos se mantienen en atmósfera húmeda por 10 min. a 37° C., en un baño de agua cerrado (Tolhurst T-1300).

7.3. PREPARACION DE LAS CORNEAS PARA ENSAYOS.

Se hace un anillo de silicón, de aproximadamente 8 mm de diámetro interior y 13 mm de diámetro exterior y justamente en la parte central se deposita una gota de solución salina para mantener equilibrada su humedad y se devuelven al baño de agua por 5 min. para posteriormente aplicar la sustancia problema.

7.4. SOLUCION DE FLUORESCEINA SODICA

2% de fluoresceína sódica en solución salina a un pH 7.0.

7.5. TIPOS DE REACCION.

- Hemorragia.- El daño a los vasos sanguíneos, incluyendo capilares, originan un sangrado.

- **Lisis vascular.**- Se observan los vasos sin sangre, como resultado del fuerte sangrado, que simula una desaparición total de vasos sanguíneos, observando sin microscopio y bajo microscopio los capilares, se aprecian seriamente dañados. Algunos surfactantes parecen que no solo lisan las células, sino también la estructura de los receptáculos sanguíneos.
- **Coagulación.**- La coagulación significa un fenómeno intra y extra vascular de desnaturalización de la proteína y es, por lo tanto, una parte importante del potencial de irritación de los surfactantes.

7.6. TRATAMIENTO DE ERITROCITOS.

Las células de sangre roja se aislaron por centrifugación de muestras citradas de sangre de terneros o cerdos recién sacrificados.

7.7. SOLUCION AMORTIGUADORA CITRADA.

Citrato de sodio más ácido cítrico en relación 66:44 mmol/ml.

7.8. CARACTERISTICAS DEL PARCHE.

Consiste en un disco de aluminio de aproximadamente 16 mm de diámetro, con un borde para prevenir el derramamiento de la muestra.