



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ENSAYOS DE EFICACIA PARA FOTOPROTECTORES BASADOS EN MÉTODOS
ALTERNATIVOS DE EURL-ECVAM**

TESIS

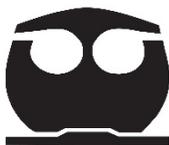
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Angélica Sofía Ramos Mejía

CDMX.

2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:** **Profesor:** Liliana Aguilar Contreras
- VOCAL:** **Profesor:** Ruth Bustamante García
- SECRETARIO:** **Profesor:** Luz Antonia Borja Calderón
- 1er. SUPLENTE:** **Profesor:** Carlos Jasso Martínez
- 2° SUPLENTE:** **Profesor:** María del Rosario López García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA (UNIPREC), FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ruth Bustamante García

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Héctor Ariel Rico Morales

SUSTENTANTE:

Angélica Sofía Ramos Mejía

Agradecimientos

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Química por abrirme las puertas, gracias por la formación como profesionista.

Quiero agradecer a la M. en C. Isabel Gracia Mora, por la oportunidad de realizar mi tesis en la UNIPREC, y por la beca que se me otorgó.

Gracias al M. en C. Héctor Rico, gracias por el aprendizaje, el conocimiento, el apoyo, los consejos y lo más importante, el tiempo es el recurso más valioso con el que cuenta el ser humano, por todo el tiempo dedicado...Gracias.

Gracias a la Dra. Ruth Bustamante por el apoyo brindado, por sus recomendaciones, por el aprendizaje y la paciencia.

Gracias a Luis Romero por el apoyo en cultivo celular, por el conocimiento y la paciencia.

Gracias a la profesora Liliana Aguilar por permitirme realizar las pruebas de viscosidad.

Quiero agradecer a mis padres, por todo el apoyo que me han brindado, por todo su esfuerzo, por darme el mejor de los ejemplos, gracias por todo lo que me han enseñado y por la oportunidad de estudiar una carrera universitaria.

Gracias a mis hermanos gracias por todo su apoyo, por motivarme, por preocuparse por mí y por darme ánimos para continuar.

Gracias al Dr. Roberto Martínez del Instituto de Química, y a su equipo de trabajo, M en C. Marcela Castillo Figa y al Dr. Jorge Peón Peralta por proporcionar el compuesto FLS-3, para probar sus propiedades.

Índice

	Pág.
ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABLAS.....	9
1. Introducción.....	10
2. Generalidades.....	11
2.1 Piel.....	11
2.2 Radiación solar.....	12
2.3 Filtros solares.....	14
2.4 Legislación en cosméticos.....	19
2.4.1 Normas Oficiales Mexicanas.....	20
2.4.2 Estabilidad de cosméticos.....	21
2.4.3 Factor de protección solar.....	23
2.5 Métodos Alternativos en cosméticos.....	23
2.6 Validación de métodos.....	25
3. Planteamiento del problema.....	26
4. Objetivos.....	26
5. Hipótesis.....	26
6. Procedimiento experimental.....	27
6.1.1 Reactivos.....	27
6.2 Propuesta del método.....	28

6.2.1 Validación del método de Citotoxicidad.....	28
6.2.2 Validación de Fototoxicidad.....	31
6.3 Caracterización del compuesto FLS-3.....	32
6.3.2 Espectros UV.....	33
6.4 Prueba de Citotoxicidad y Fototoxicidad.....	33
6.5 Propuesta de formulación de un producto de prueba con el compuesto FLS-3....	33
6.7. Análisis estadístico.....	37
7. Resultados.....	37
7.1 Atributos del compuesto FLS-3.....	37
7.2 Validación del método.....	37
7.3 Espectros de luz UV.....	45
7.4 Citotoxicidad y Fototoxicidad del producto de prueba.....	48
7.4.1 Citotoxicidad del producto de prueba.....	48
7.4.2 Fototoxicidad del producto de prueba.....	49
7.5 Formulación de un producto de prueba con el compuesto FLS-3.....	49
7.5.1 Productos control y prueba.....	50
7.5.2 Citotoxicidad del producto de prueba con el compuesto FLS-3.....	51
7.5.3 Fototoxicidad del producto de prueba con el compuesto FLS-3.....	52
7.6 Comparación con producto comercial.....	53
7.6.1 Citotoxicidad producto comercial.....	53
7.6.2 Fototoxicidad producto comercial.....	54

8	Análisis de resultados.....	56
9	Conclusiones.....	59
10	Anexos.....	60
11	Referencias.....	63

Abreviaturas

ANDEVA: Análisis de Varianza.

ATCC: American Type Culture Collection).

cm²: Centímetro cuadrado.

cP: Centipoise.

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DOF: Diario Oficial de la Federación.

ECVAM: European Centre Validation Alternative Methods

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.

EURL: European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing

FDA: Food and Drug Administration.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

FPS: Factor de Protección Solar.

H₂O: Agua.

INVITTOX: *In-vitro* Techniques in Toxicology

ISO: International Organization for Standardization.

mM: Milimolar.

mm²: Milímetro cuadrado.

M: Molar.

mg: Miligramos.

mL: Mililitros.

μL: Microlitros.

nm: Nanómetros.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

O₂: Oxígeno.

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.

PABA: Ácido *p*-amino benzoico.

PBS: Buffer de Fosfato y solución Salina.

pH: Potencial Hidrógeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SRB: Sulforrodamina.

TiO₂: Dióxido de titanio.

UV: Ultravioleta.

ZnO: Óxido de Zinc.

%v/v: Porcentaje volumen/volumen.

%CV: Coeficiente de variación

LISTA DE FIGURAS

Nº de Figura	Pág.
Figura 1. Estructura de la piel.....	11
Figura 2. Daño de radiación en piel.....	14
Figura 3. Estructura del ácido <i>p</i> -aminobenzóico.....	15
Figura 4. Estructura del homosalato.....	16
Figura 5. Estructura de la benzofenona.....	16
Figura 6. Estructura del ácido ascórbico.....	18
Figura 7. Estructura de la procianidina B1.....	18
Figura 8. Placa de 96 pozos con la distribución de las concentraciones.....	31
Figura 9. Placa con la distribución de las concentraciones del producto de referencia.....	31
Figura 10. Posición de la caja con respecto a la campana.....	32
Figura 11. Diagrama de flujo de citotoxicidad y fototoxicidad.....	35
Figura 12. Diagrama de flujo del filtro base y el filtro de prueba.....	36
Figura 13. Linealidad. Compuesto de prueba.....	44
Figura 14. Linealidad. Filtro de prueba (formulación).....	45
Figura 15. Espectro de Luz UV del compuesto FLS-3 con acetona.....	46
Figura 16. Espectro de Luz UV del compuesto FLS-3 con DMSO.....	47
Figura 17. Citotoxicidad del producto de prueba.....	48
Figura 18. Fototoxicidad del producto de prueba.....	49
Figura 19. Producto con el compuesto FLS-3 y filtro base.....	50
Figura 20. Citotoxicidad del filtro de prueba.....	52
Figura 21. Fototoxicidad del filtro de prueba.....	53
Figura 22. Citotoxicidad del producto comercial.....	54
Figura 23. Fototoxicidad del producto comercial.....	55

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipos de estudio de estabilidad. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.....	21
Tabla 2. Pruebas para semisólidos. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.....	22
Tabla 3. Características de etiquetado de fotoprotectores	23
Tabla 4. Métodos alternativos al uso de animales.....	24
Tabla 5. Excipientes y % de la formulación del filtro solar propuesta.....	34
Tabla 6. Atributos FLS-3.....	37
Tabla 7. Repetibilidad. Citotoxicidad del compuesto FLS-3.....	38
Tabla 8. Repetibilidad. Fototoxicidad del compuesto de prueba FLS-3.....	39
Tabla 9. Repetibilidad de la citotoxicidad formulación.....	40
Tabla 10. Repetibilidad de la Fototoxicidad de la formulación.....	40
Tabla 11. Reproducibilidad. Citotoxicidad del compuesto FLS-3.....	41
Tabla 12. Reproducibilidad. Fototoxicidad del compuesto FLS-3.....	42
Tabla 13. Reproducibilidad. Citotoxicidad de la formulación.....	42
Tabla 14. Reproducibilidad. Fototoxicidad de la formulación.....	43
Tabla 15. Absorbancia del compuesto FLS-3 barrido de luz UV.....	46
Tabla 16. Absorbancia de barrido de luz UV con DMSO.....	47
Tabla 17. Funciones de los excipientes de la formulación.....	50
Tabla 18. Especificaciones de la formulación base y con el producto de prueba FLS-3 al 1%.....	51

1. Introducción

En la actualidad los productos fotoprotectores son necesarios para una práctica responsable de las exposiciones de la piel a la acción del sol, protegiéndola de los efectos perjudiciales de las diversas radiaciones solares, entre ellos la fototoxicidad, la cual puede ser clasificada como una respuesta cutánea anormal, la cual ocurre como resultado de la exposición a luz ultravioleta o visible y está relacionada con la presencia de xenobióticos, los cuales se pueden presentar local o sistemáticamente en el cuerpo y que puede derivar a patologías severas como el cáncer de piel, por lo que el desarrollo de nuevas sustancias que puedan prevenir o evitar la fototoxicidad van en aumento, sin embargo los métodos de evaluación en animales de laboratorio son invasivos, por lo que el uso de alternativas para su evaluación han dado pauta de la utilización de cultivos celulares para este fin; por lo que para la evaluación del FLS-3 compuesto de síntesis química proporcionado por el Dr. Roberto Martínez y colaboradores del Instituto de Química, se realizaron los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad, en células de fibroblasto de ratón (línea celular 3T3) un método alternativo para la evaluación de fototoxicidad (In-vitro Techniques in Toxicology Invitox N° 44 del European Centre Validation Alternative Methods (ECVAM), los cuales fueron previamente validados. Los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad cumplieron con los parámetros de reproducibilidad y repetibilidad, así mismo, los resultados obtenidos para el FLS-3 determinaron que no fue citotóxico ni fototóxico a las dosis evaluadas (0.15, 0.3, 25, 40 y 50 µg/mL).

2. GENERALIDADES

2.1 Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y comprende aproximadamente el 16% de la masa corporal; es un órgano complejo que constituye una barrera física de permeabilidad, protección contra los agentes infecciosos, termorregulación, protección contra la luz ultravioleta, reparación de las heridas y regeneración¹, por otro lado, cabe mencionar que a través de la piel, puede permitir el paso de algunas sustancias las cuales pueden ser transportadas principalmente por difusión pasiva y absorbidas en el tejido, que posteriormente, después del contacto, estas sustancias pueden penetrar al estrato córneo y luego alcanzar la epidermis y la dermis donde el sistema vascular está alojado². En relación a su estructura está constituida por tres zonas: epidermis, dermis, hipodermis o tejido subcutáneo³ (Figura 1).

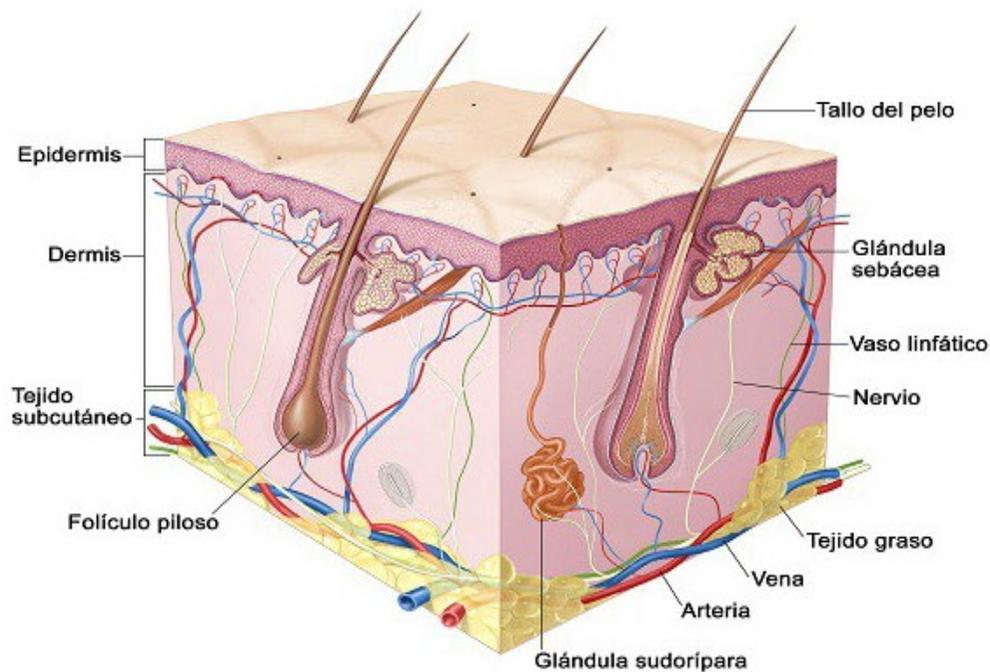


Figura 1. Estructura de la piel (www.cancer.gov)

La epidermis es la parte más superficial y delgada, constituida por epitelio plano estratificado queratinizado, donde el 90% de las células epidérmicas son los queratinocitos que se organizan en capas o estratos⁴, siendo estos: el estrato basal germinativo, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido (solo en palmas de manos y plantas de los pies) y estrato córneo. Por

otro lado, la dermis es la capa intermedia de la piel la cual es gruesa y elástica; está compuesta por colágeno y fibras elásticas, en esta se encuentran diversos tipos de células como fibroblastos, macrófagos, linfocitos y mastocitos. La capa inferior es rica en colágeno el cual aporta firmeza al tejido conjuntivo cutáneo⁵. Las fibras de colágeno componen el elemento más importante de la dermis y le brindan su firmeza mecánica. La síntesis de colágeno se realiza a nivel intracelular y su organización (fibrillas, fibras), a nivel extracelular igual que su destrucción (colagenasas y proteasas). En la piel destacan los colágenos tipo I, III, V y VI a nivel intersticial y los de tipo IV y VII en la membrana basal. Las fibras elásticas se componen de proteínas microfibrilares con una matriz de elastina y forman en la dermis una red que aporta a la piel su elasticidad⁵; y por último la hipodermis o grasa subcutánea, es otro importante componente de la piel, pues sirve como protección contra golpes, protegiendo estructuras vitales; manteniendo el calor corporal, al actuar de aislante y de reservorio de energía en caso de ayuno. Además, permite el desplazamiento y movilidad de la piel sobre los planos profundos. Es el soporte de vasos sanguíneos y nervios que pasan desde los tejidos subyacentes hacia la dermis. En esta capa se originan los folículos pilosos y glándulas sudoríparas⁵. De acuerdo a estas características de las capas de la piel y la funciones de estas hay que tomar en cuenta que existen diversos factores como la contaminación, las picaduras de insectos, la herencia, hormonas, contaminantes industriales, sustancias irritantes en el hogar y la oficina, tales como aerosoles, jabones, productos de limpieza, aditivos, detergentes o suavizantes para la ropa, medicamentos, hábitos incluyendo los alimenticios, estrés, ejercicio y la exposición a la radiación UV⁶.

2.2 Radiación solar

La radiación (componente de la luz solar natural que se recibe en la tierra); está compuesta por radiación UVB (0.3%), UVA (5.1%), luz visible (62.7%) y luz infrarroja (31.9%)⁸. La importancia del conocimiento de la exposición diaria y periodos prolongados de la radiación solar es la posibilidad de causar daño y /o alteraciones a nivel molecular en la piel que pueden ir desde afecciones leves como eritema, edema, dermatitis o graves como quemaduras o cáncer así como alteraciones oculares y del sistema inmunitario⁹. La OMS ha definido una escala para el Índice UV (medida de la intensidad de la radiación UV en la superficie terrestre y se expresa como un valor superior a cero) que va de 1 a 11+, sin embargo, en algunas ciudades,

incluyendo la Ciudad de México, se utiliza el valor de 0 para referirse a la ausencia de radiación. El valor de 11+ se utiliza para expresar un índice de 11 o superior. Cuando el Índice UV alcanza o supera el valor de 11 existe un riesgo importante de sufrir daños en la piel sin protección en un periodo de tiempo breve. En la Ciudad de México el Índice puede alcanzar un valor máximo equivalente a 15, sin embargo, se reporta como 11+ en apego a las recomendaciones de la OMS⁹. Es importante considerar que la intensidad de la radiación UV depende de diferentes factores estos son: la altura del sol en donde cuanto más alto está el sol es más intensa la radiación UV; la reflexión por el suelo ya que los diferentes tipos de superficies reflejan o dispersan la radiación UV en diversa medida (por ejemplo, la nieve, la arena seca de la playa, la espuma del agua del mar y la altitud); la latitud siendo más intensa la radiación UV cuando se está más cerca del ecuador; la nubosidad siendo la intensidad de la radiación UV máxima cuando no hay nubes, pero puede ser alta incluso con nubes, ya que la dispersión puede producir el mismo efecto que la reflexión por diferentes superficies, aumentando la intensidad total de la radiación UV; la altitud esto dado que a mayor altitud la atmósfera es más delgada y absorbe una menor proporción de radiación UV y por último la capa de ozono debido a que este absorbe parte de la radiación UV, es importante considerar que la concentración de ozono varía a lo largo del año e incluso del día 16.

Así mismo, la radiación UV constituye uno de los agentes físicos causantes de mutaciones en los más diversos organismos del planeta y están ligadas a los procesos de fotocarcinogénesis⁸, además es posible que la radiación UV puede generar diferentes tipos de daño, entre ellos envejecimiento cutáneo prematuro de la piel (foto envejecimiento), aparición de pecas causado por aumento de melanina en la epidermis; léntigos los cuales se producen por un aumento de los melanocitos de la epidermis y son inducidas por la sobreexposición solar y la hiperpigmentación facial (manchas de color marrón claro u oscuro, que se desarrolla o cloasma de forma lenta y simétrica). Cabe mencionar que los tipos de daño solar dependen del tipo de radiación a la que fue expuesta, como se muestra en la Figura 2, donde las consecuencias dependen de la capa de piel que fue lesionada.

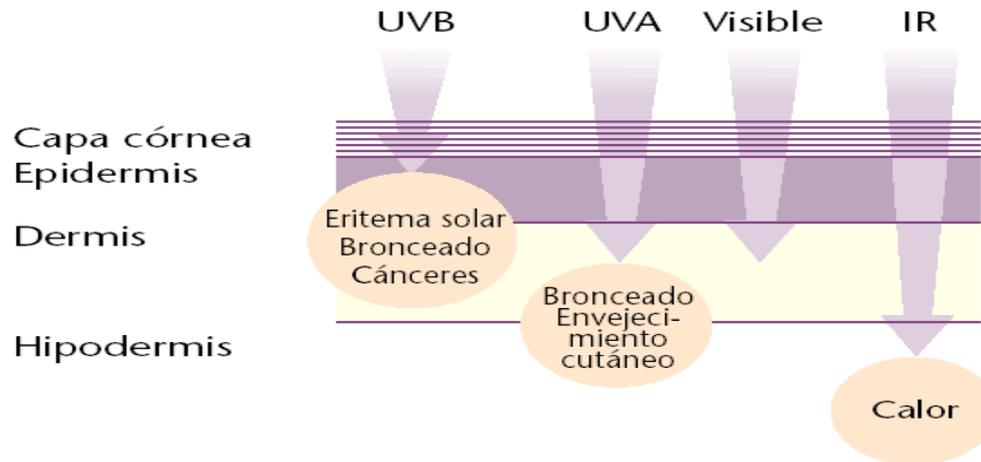


Figura 2. Daño de radiación en piel¹¹. UVB (280-320 nm): responsable de la aparición de eritema, el envejecimiento cutáneo y daño a la piel. UVA (320-400 nm): encargado del bronceado, envejecimiento prematuro, daño al DNA, cáncer de piel, aún en ausencia de bronceado.

Es por esta razón que existen diferentes compuestos para bloquear dichos rayos, cuya función principal es proteger a la piel contra la radiación UV absorbiendo, reflejando o dispersando esta radiación¹⁹. Dentro de la amplia gama de estos productos están los protectores solares como los filtros solares, que incluyen compuestos fotoprotectores los cuales pueden estar incluidos en cualquier presentación cosmética como crema, aceite, gel o aerosol entre otros¹⁷.

2.3. Filtros solares

Los tipos de filtros solares se pueden clasificar de acuerdo a su modo de acción en: físicos, químicos y biológicos.

Los filtros solares físicos son sustancias inorgánicas que actúan como pantalla, estos pueden reducir y eliminar los efectos de las radiaciones ultravioleta sobre la piel y reflejan las radiaciones incidentes. Se trata, normalmente, de pigmentos minerales como el dióxido de titanio (TiO₂) y el óxido de zinc (ZnO) los cuales funcionan principalmente por dispersión de la radiación UV. Una innovación en su formulación reside en los pigmentos micronizados, con un tamaño de partícula de 10-50 nm¹³. El TiO₂ y el ZnO son considerados como protectores de amplio espectro. Se componen de partículas grandes, que, en las formulaciones de protección solar tradicionales, aparecen en la piel como una pasta blanca y espesa. Al minimizar o "micronizar" el tamaño de las partículas de protección solar, se reduce la opacidad característica de los ingredientes, dándole a la piel una apariencia mucho más natural.

Los filtros solares químicos, son moléculas orgánicas con grupos cromóforos en la región UV, de estructura electrónica resonante. Actúan por absorción de la radiación solar ultravioleta (captan energía incidente y se emite nuevamente como radiación térmica, inocua para la piel). En función de la longitud de onda absorbida se distingue entre los filtros UVB, UVA y de amplio espectro. Requieren del orden de 30 min para ejercer esta acción, por lo que, deben emplearse con la debida antelación antes de la exposición solar. No suelen presentar problemas de formulación y por esto son los más utilizados. Dado que pueden absorberse por la piel, hay riesgo de intolerancia, y por tal motivo se recomienda su aplicación en niños, pieles lesionadas donde haya riesgo de absorción (cicatrices recientes, quemaduras), pieles intolerantes, etc.¹⁶. Dentro de los protectores solares químicos se encuentran filtros para UVB y UVA. Los filtros UVB absorben la luz en el intervalo de 280-320 nm, y su máximo de absorción se sitúa entre 305 y 310 nm, es decir en el máximo de efectividad eritémica, dentro de estos tenemos a el ácido p-aminobenzoico (PABA; Figura 3), en donde se puede ver un grupo carboxilo, el cual contiene oxígeno, dicho elemento puede ayudar a la reflexión de la luz UV. El PABA se une a las proteínas epidérmicas mediante puentes de hidrógeno. Aunque este hecho mejora su sustentividad, puede aumentar el riesgo de dermatitis de contacto o de fotocontacto. Este inconveniente se evita esterificando el grupo carbonilo y sustituyendo el nitrógeno, generando así los derivados del PABA. Los más empleados son los ésteres del PABA: palmitato O (octildimetil-PABA) y palmitato A (amil-dimetil-PABA). Las concentraciones máximas a las que se deben emplear estos filtros son del 5%¹⁴.

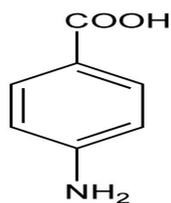


Figura 3. Estructura del ácido p-aminobenzóico⁵⁴.

Otro tipo de compuesto son los Cinamatos, donde el más utilizado es el octilmetoxicinamato, sin embargo, este filtro es insoluble en agua, glicerina y propilenglicol. La concentración máxima permitida es del 5%. Se ha comprobado que tiene capacidad de proteger frente a la inmunosupresión producida por la radiación solar¹⁴. En el caso de los salicilatos, agentes

aromáticos, que tienden a presentar buena solubilidad en aceites minerales, alcohol isopropílico y etílico, no están considerados como fotoprotectores de gran eficacia, así mismo, se restringe su uso en niños menores de 3 años, sin embargo, cabe destacar que son sustancias muy estables, no sensibilizantes e insolubles en agua. El compuesto representativo de este grupo está el homosalato (Figura 4), compuesto donde se pueden observar dobles enlaces, los cuales funcionan como grupos cromóforos (utilizado como el estándar de los fotoprotectores). Por tanto, los salicilatos se suelen combinar con benzofenonas, insolubles también en agua, para mejorar el factor de protección final¹⁴.

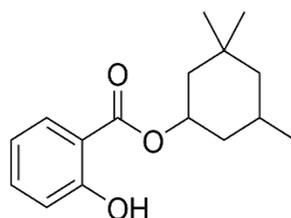


Figura 4. Estructura del homosalato⁵⁴.

Por otro lado, los filtros químicos para UVA contemplan compuestos como las benzofenonas y sus derivados (Figura 5), los cuales destacan sus grupos cromóforos (R). Estas moléculas presentan una doble capacidad de absorción tanto en la franja del UVB como del UVA corto y medio. Son cetonas aromáticas muy fotoestables y que no producen fotosensibilidad. El derivado más empleado es la oxibenzona, pero tiene el inconveniente de presentar, en ocasiones, problemas de intolerancia cutánea, siendo obligatorio en la Unión Europea declarar su presencia en el envase si su concentración es superior a 0.5%. Se permite su empleo a concentraciones no superiores al 10%¹⁴.

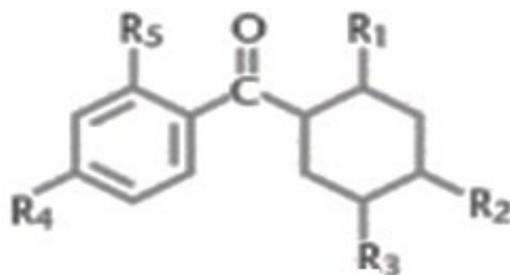


Figura 5. Derivado de Benzofenona¹⁴.

La avobenzona es un compuesto que proporciona la absorción más alta y más amplia, y es posible hacer combinaciones de este con otros filtros para una máxima protección UVA. Para usar avobenzona se debe tener en cuenta que este filtro UVA no es fotoestable por sí solo o en combinación con algunos filtros específicos, y se deteriora durante la exposición al sol al aire libre³⁷.

El benciliden-alcanfor cuya estructura se relaciona químicamente con la del ácido tereftalidenedibornano-sulfónico, conocido comercialmente como Mexoryl SX, presentan buena estabilidad al calor y a la luz, junto con una buena tolerancia cutánea. La concentración máxima a la que se pueden utilizar es del 15%¹⁴. El máximo de absorción de este compuesto está en el límite entre los rayos UVA cortos y UVA largos y posee gran capacidad de absorción de los rayos UVA cortos, además de absorber el UVB.

Por último, dentro de los filtros biológicos tenemos a compuestos antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y, por lo tanto, potencian el subsistema inmunológico cutáneo. Se utilizan cada vez con mayor profusión, y las vitaminas A (betacarotenos), C y E son las más utilizadas (en forma de acetato o palmitato). Para las dos últimas, se ha demostrado que, aplicadas por vía tópica, tienen propiedades antiradicales libres y actúan contra el envejecimiento cutáneo y los cánceres de piel fotoinducidos, que en numerosas ocasiones son consecuencia, a largo plazo, de una exposición prolongada al sol. La combinación de filtros químicos UVA/UVB y antioxidantes da lugar a preparados de amplio espectro de protección solar y elevada eficacia¹⁶. Sin embargo, hoy en día, en las fórmulas de los fotoprotectores se encuentran ingredientes cuyo mecanismo de acción no se basa en la absorción, reflexión y/o dispersión de la radiación solar, sino en el desarrollo de una actividad antioxidante, secuestradora de electrones o radicales libres, e incluso reparadora de los daños producidos por el sol. También pueden actuar como coadyuvantes de la actividad fotoprotectora de otros filtros. Dentro de estos podemos incluir a la melanina. Las melaninas son un grupo de pigmentos naturales que se encuentran en la mayoría de los organismos y se han utilizado de forma amplia y convencional en diferentes campos industriales, incluidos alimentos, cosméticos y medicamentos por su acción antioxidante³⁸. El ácido ascórbico (Figura 6) es otro ejemplo, ya que, se ha estudiado que la radiación solar se reduce drásticamente cuando en la piel se encuentra vitamina C. Además, se ha comprobado, que la aplicación del ácido ascórbico en piel

de cerdo, hay disminución del eritema y del número de células necrosadas producidas por la radiación UVB, ya que esta vitamina se le han atribuido propiedades con actividad antioxidante y neutralizadora de radicales libres, además de promover la síntesis de colágeno¹⁴.

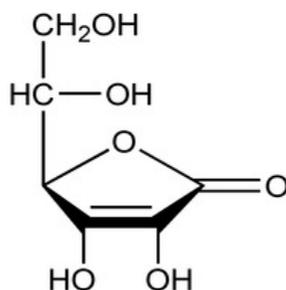


Figura 6. Estructura del ácido ascórbico⁵⁴.

En el caso de la vitamina E, si se aplica dérmicamente es contribuir a la defensa antioxidante de la piel, porque ésta tiende a absorber la luz UV en la región del espectro solar que es responsable de los efectos biológicos dañinos del sol. La vitamina E bloquea la peroxidación de lípidos en células y tejidos y es un buen antioxidante²³. La acción combinada de vitamina E y vitamina C potencia la acción de cada una de ellas.

En el caso de la *Vitisvinifera*. Las procianidinas (Figura 7), donde se pueden observar grupos cromóforos OH de la uva protegen la piel de los daños inducidos por la radiación UV. La mezcla de los polifenoles actúa como antioxidante, capaz de contrarrestar la acción de los radicales libres¹⁴.

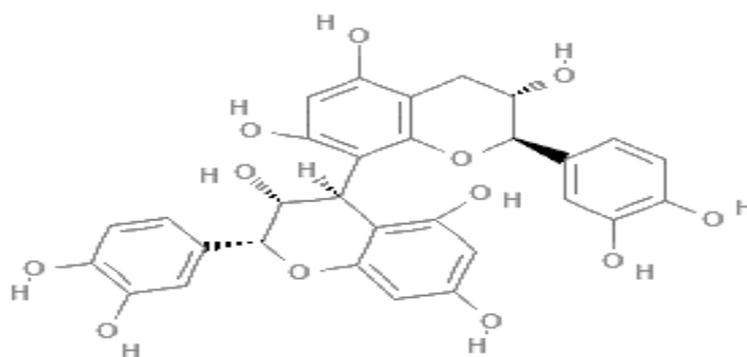


Figura 7. Estructura de la procianidina B1⁵⁵.

A pesar de esta gama de compuestos, se sigue realizando la síntesis de nuevos compuestos que puedan tener un excelente potencial fotoprotector con mejores atributos que puedan ser

utilizados para este fin, como es el caso del FLS-3, compuesto que fue sintetizado por el Dr. Roberto Martínez del Instituto de Química, cuyas propiedades son cristales amarillos, soluble en DMSO y en acetona, punto de fusión 249-250°C y masa molecular: 316.35 g/mol.

Para la evaluación de este tipo de compuestos es importante evaluar la seguridad y eficacia, siendo importante conocer la normatividad y legislación vigente de cada país, cabe mencionar que, en relación al sector cosmético, en México se está tratando de homologar criterios acordes a lo referido en normas, lineamientos y guías internacionales, por mencionar algunas. En la última década del siglo XX los principales mercados de cosméticos fueron regulados por diferentes modelos; un modelo liberal en Estados Unidos basado en regulaciones que datan de finales de 1930, mientras que en la Unión Europea se adoptó un enfoque moderno basado en el riesgo. Recientemente, el enfoque europeo se ha convertido en un modelo internacional, el cual es fácil de entender y más o menos de implementar. No obstante, se siguen presentando diferencias entre países y bloques comerciales respecto a temas específicos tales como las definiciones de cosmético, los requisitos de etiquetado y la lista de ingredientes que están permitidos, restringidos o prohibidos²⁴.

2.4. Legislación en Cosméticos

Dentro del contexto internacional, la ISO 22716 proporciona un enfoque global para un sistema de gestión y establece directrices para la producción, control, almacenamiento y distribución para los profesionales de la fabricación de los productos cosméticos, destinadas a proporcionar una guía de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), acorde con los fundamentos que establece el nuevo Reglamento Europeo para la industria cosmética⁴⁴. Dicha ISO conforma una base para el cumplimiento de la calidad y seguridad en la cadena de distribución de los productos cosméticos aceptada internacionalmente; controla y reduce la peligrosidad de los productos cosméticos y promueve la mejora continua a lo largo de toda la cadena de distribución⁴⁴.

La ISO 11930:2012 indica las pautas para la evaluación de riesgos e identificación de productos microbiológicamente de bajo y alto riesgo⁴¹.

En el caso de la ISO 24443: 2012 especifica un procedimiento *In vitro* para caracterizar la protección UVA de los productos de protección solar. Las especificaciones se proporcionan

para permitir la determinación de las características de absorbancia espectral de la protección UVA de forma reproducible⁴⁶.

En México La Secretaría de Salud, por conducto de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), cuenta con un marco jurídico que, de acuerdo con la Ley General de Salud, tiene el propósito de regular la producción y comercialización de toda clase de cosméticos, entre los que destacan los relacionados con la perfumería, la belleza y el aseo, así como los servicios derivados de esas actividades. Como principal órgano de regulación, está el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios, publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) el 9 de agosto de 1999. Así mismo, se han publicado en el DOF cuatro Normas Oficiales Mexicanas y un Acuerdo. Este último, tiene la finalidad de determinar las sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza. Este Acuerdo data del 15 de julio de 1999²⁰.

2.4.1. Normas Oficiales Mexicanas

NOM 039–SSA1–1993. Bienes y Servicios. Servicios de Perfumería y Belleza. Determinación de los índices de irritación ocular primaria dérmica y sensibilización. Publicada en el DOF el 10 de marzo de 1995 (Derogada en 2014). Esta norma indicaba los estudios que se tenían que hacer anteriormente, y que se llevaban a cabo en animales de laboratorio.

NOM 118–SSA1–1994. Bienes y Servicios. Materias Primas para Alimentos. Productos de Perfumería y Belleza. Colorantes y Pigmentos inorgánicos. Especificaciones sanitarias. Publicada en el DOF el 20 de septiembre de 1995²¹. Para efectos de esta Norma los colorantes y pigmentos inorgánicos permitidos se clasifican por su uso. Dentro de los productos de perfumería y belleza, se pueden utilizar en los protectores solares sustancias como las siguientes: dióxido de titanio, óxido de zinc y óxido de hierro.

NOM 141–SSA1–1995. Bienes y Servicios. Etiquetado para Productos de Perfumería y Belleza Pre-ensados. Publicada en el DOF el 18 de julio de 1997 (COFEPRIS), en dicha norma indica las características de etiquetado de los filtros solares¹⁹.

NOM-089-SSA1-1994, Bienes y servicios. Métodos para la determinación del contenido microbiano en productos de belleza. Esta norma se utiliza con el fin de conocer la calidad sanitaria y precisar si los cosméticos son aptos para uso humano.

En cosméticos no hay una norma que indique específicamente como evaluar y determinar si un producto es estable, por lo que se considera la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.

2.4.2 Estabilidad de cosméticos

La estabilidad se define como la capacidad de un producto de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil⁴⁸. Las condiciones para casos generales son las que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de estudio de estabilidad. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.

Tipo de estudio	Condiciones de almacenamiento	Periodo mínimo (meses)	Frecuencia de análisis (meses)
Estabilidad	40 °C ±2°C / 75% ±5% HR	6	0, 3 y 6
Estabilidad a condición media	30°C ±2°C / 65% ± 5% HR	6	0, 3 y 6
Estabilidad a largo plazo	25°C ± 2 °C / 60% ±5% HR o 30°C	12	0, 3, 6, 9 y 12

HR: Humedad Relativa

Cabe mencionar que para el estudio de estabilidad se deben incluir otras pruebas de acuerdo a la presentación y uso del producto como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas para semisólidos. NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos.

Parámetro	Gel, crema y ungüento tópico	Gel, crema y ungüento ótico u oftálmico
Apariencia (incluyendo consistencia)	✓	✓
Color	✓	✓
Olor	✓	✓
Ensayo	✓	✓
pH	✓	✓
Material Particulado	NA	✓
Pérdida de peso	✓	✓
Viscosidad	✓	✓
Contenido de conservadores	✓	✓
Esterilidad (inicial y final)	NA	✓
Límite microbiano (inicio y final)	✓	NA

NA: No aplica

En el caso de productos de protección solar se realizan declaraciones sobre nivel de protección, estas declaraciones deben ser sencillas y no ambiguas. El nivel de protección del producto debe figurar mediante la clasificación como baja, media, alta y muy alta. Cada clasificación debe equivaler a un grado de protección frente a ambas radiaciones, UVB y UVA de acuerdo a lo que establece la NOM 141-SSA1/ SCFI-2012 (Tabla 3) donde destacan los factores de protección solar¹⁹.

Tabla 3. Características de etiquetado de fotoprotectores¹⁹

Clasificación	Factor de protección solar que se indica en la etiqueta	Factor de protección solar medido	Factor mínimo de protección UVA recomendado	Longitud de onda crítica mínima recomendada
Protección baja	6	6.0-9.9	1/3 del factor de protección solar que se indica en la etiqueta	370 nm
	10	10.0-14.9		
Protección media	15	15.0-19.9		
	20	20.0-24.9		
	25	25.0-29.9		
Protección alta	30	30.0-49.9		
	50	50.0-59.9		
Protección muy alta	50 +	Igual o mayor a 60.0		

2.4.3 Factor de protección solar

El factor de protección solar (FPS) se denomina al número de veces que el fotoprotector aumenta la capacidad de defensa natural de la piel frente al eritema o enrojecimiento previo a la quemadura. Se debe considerar que la definición sólo indica la capacidad de protección frente al eritema y no frente a los otros efectos producidos por la radiación UVA¹³. Los filtros solares deben ofrecer un grado mínimo de protección frente a ambas radiaciones, UVB y UVA, donde el grado mínimo de protección de los productos antisolares debe ser de un factor 6 de protección solar frente a la radiación UVB y un factor de protección frente a la radiación UVA de al menos 1/3 del factor de protección solar UVB.

Aunado a estas pruebas, es importante mencionar que hoy en día, se contemplan métodos alternativos para la evaluación de seguridad y eficacia en cosméticos para evitar o disminuir el uso de animales de laboratorio para pruebas como irritabilidad, sensibilidad, absorción dérmica, entre otras.

2.5. Métodos Alternativos en cosméticos

La sociedad y la ética demandan nuevos métodos de evaluación de productos no sólo cosméticos, por lo que, se han planteado nuevas alternativas a la experimentación animal, tales procedimientos describen cualquier cambio en los protocolos oficiales que contribuyan al refinamiento de las técnicas, la reducción del número de animales utilizados o el reemplazo de los mismos (principios de las 3R's)³⁵, como son los métodos alternativos propuestos para

lo European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing- European Centre Validation Alternative Methods (EURL-ECVAM) que permiten realizar pruebas de seguridad y de eficacia/potencia de productos químicos, biológicos y vacunas^{15,36}. Entre estos métodos alternativos, se encuentran los ensayos de fototoxicidad, los cuales son requeridos para todos aquellos productos que puedan incrementar su toxicidad por exposición a la luz ultravioleta. En la Tabla 4 se muestran algunos métodos alternativos, que se utilizan actualmente, dichos métodos adquieren importancia, debido a que los objetivos que tienen a futuro son: Incorporar un refinamiento de los procedimientos, de modo que disminuyen el dolor o malestar de los animales, o bien aumentan su bienestar, permitir una reducción en el número de animales utilizados, así como, facilitar el reemplazo del uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos, o emplean otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal³⁶.

Tabla 4. Métodos alternativos al uso de animales³⁶.

Método	Uso
Prueba RBC (Red BloodCell)	Esta prueba se utiliza para determinar el potencial fototóxico de una sustancia química o productos finales.
Prueba de HET-CAM	Esta prueba es una alternativa a la prueba de irritación realizada previamente en la mucosa conjuntival de conejos (Prueba de Draize).
Episkin	Modelo de epidermis humana reconstruida, se utilizan queratinocitos, se prueban efectos citotóxicos de irritantes.
Epiocular	Método utilizado como modelo alternativo al método de Draize. Utilizado en industria farmacéutica y cosmética.

La ventaja principal de los métodos alternativos radica en las consideraciones éticas alrededor del uso de animales de experimentación. Aunque no se puede ni se debe generalizar, algunos métodos alternativos permiten ahorrar tiempo en la realización y en los costos. Sobre estas técnicas se puede ejercer un mejor control de las variables y así modificarlas de modo secuencial. En determinadas circunstancias, se puede aprovechar una mayor versatilidad en el diseño, posibilidad de poder utilizar células humanas y en algún tipo de estudio de nuevas moléculas. Puede ser de vital importancia, utilizar cantidades muy pequeñas de sustancias³⁶.

Entre los métodos alternativos, se encuentran los ensayos de fototoxicidad, los cuales son requeridos para todos aquellos productos que puedan incrementar su toxicidad por exposición a la luz ultravioleta.

De acuerdo a la legislación europea, en donde no se permiten las pruebas con animales, se establecen protocolos, en donde se utilizan líneas celulares para determinar el potencial fototóxico de las sustancias, como es el protocolo de *Invitox* N° 44, de Fototoxicidad. Esta prueba está designada para reproducir tal respuesta de cultivos celulares para incrementar periodos de exposición a radiación ultravioleta, en ausencia y presencia de compuestos de prueba y es requerida para todos aquellos productos que puedan incrementar su toxicidad por exposición a la luz ultravioleta, sin embargo, existen métodos alternos cuyo objetivo es evaluar la fototoxicidad. Sin embargo, estos métodos deben proveer resultados confiables, reproducibles y extrapolables en mayor medida, por lo que es importante asegurar la validación de estos.

2.6. Validación de métodos

La validación es un proceso de seguimiento que comprende la determinación de una serie de parámetros que demuestren que los resultados del método son confiables y reproducibles⁵². Por el tipo de producto, para la validación del método de citotoxicidad y fototoxicidad, sólo se evaluarán los parámetros: repetibilidad, reproducibilidad y linealidad del método.

La precisión se evalúa en términos de repetibilidad (precisión intra-día), se define como la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto. La reproducibilidad (precisión intermedia o inter-día) puede expresarse como la precisión entre los laboratorios (estudios colaborativos, generalmente se aplica a la estandarización de la metodología)⁵¹.

Linealidad. La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra⁵¹. Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente o por medio de transformaciones matemáticas proporcionales a la concentración de la sustancia a analizar en la muestra dentro de un rango establecido⁵².

3. Planteamiento del problema

Dado el racional de la aplicación de las 3 R's, con el fin de remplazar el uso de animales por métodos alternativos para la evaluación de seguridad y eficacia de nuevos productos, se plantearon los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad mediante el uso de células de fibroblasto de ratón (línea celular 3T3), dichos ensayos fueron validados, para lo cual se utilizó el compuesto FLS-3 proporcionado por el Dr. Roberto Martínez del Instituto de Química (patente en proceso), el cual, al absorber en las longitudes de onda que corresponden al rango de UVA y UVB, podría utilizarse como principio activo en un filtro solar.

4. Objetivos

- Establecer los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad por un método alternativo del European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing- European Centre Validation Alternative Methods (EURL-ECVAM), por medio de una prueba de fototoxicidad en cultivos celulares protocolo N° 44 de *In-vitro* Techniques in Toxicology (*Invitox*).
- Validar los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad para evaluar el potencial fototóxico del compuesto FLS-3.
- Desarrollar una formulación utilizando el compuesto FLS-3.

5. Hipótesis

Si los ensayos planteados de citotoxicidad y fototoxicidad cumplen con los parámetros de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad entonces se considerarán validados para determinar el potencial fototóxico de cualquier compuesto.

Si la viabilidad de las células 3T3 en los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad del compuesto FLS-3 disminuye al estar en exposición a la luz Ultravioleta, entonces el compuesto es fototóxico.

6. Procedimiento Experimental

6.1. Reactivos

Compuesto de prueba FLS-3

El compuesto FLS-3 fue proporcionado por el Dr. Roberto Martínez del Instituto de Química. Se revisaron las características organolépticas del FLS-3 como color forma y apariencia, así mismo, se realizaron las pruebas de solubilidad del compuesto utilizando los solventes acetona y DMSO de acuerdo a la FEUM No. 15, para lo cual se midió el grado de disolución de un polvo dentro de 30 minutos en un disolvente a la temperatura de 25° C con agitación vigorosa durante 30 s a intervalos de 5 minutos, (Anexo I), donde para determinar si el compuesto es fácilmente soluble, corresponde a 1 a 10 partes de disolvente en volumen requeridas para una parte de soluto.

Para la determinación del pH del compuesto se realizó la disolución del compuesto en acetona y DMSO, se midió con tira reactiva.

Se realizaron los espectros de luz UV del compuesto utilizando el método general de análisis (MGA) 0361 de la FEUM No. 15. El espectro UV de la preparación de la muestra, corresponde al obtenido con la preparación de referencia.

Se prepararon dos soluciones stock de concentración 1 mg/mL, del compuesto FLS-3, se utilizaron como solventes acetona y DMSO para cada solución, de éstas se realizaron las diluciones para obtener concentraciones de 0.0375 mg/mL para acetona, y 0.013 mg/mL para DMSO, se midió el blanco y se realizó un barrido de luz UV, con un rango de longitud de onda de 210 a 500 nm utilizando el espectrofotómetro (Marca: Labomed Inc. Espectro UV-Vis Dual Beam 8 Auto Cell).

Producto comercial

Se utilizó el producto comercial Loción protectora solar: Hawaiian Tropic Ozone® de FPS50 cuyos ingredientes activos fueron octocrileno y benzofenona-3, como referencia y para el análisis comparativo con la formulación con el FLS-3 al 1 %.

Cultivo celular

Para las pruebas de citotoxicidad y fototoxicidad, se utilizó la línea celular 3T3-L1 de fibroblasto de ratón del American Type Culture Collection (ATCC), catálogo No. 30-2002. Las monocapas de células 3T3 de ratón se expusieron a concentraciones crecientes de pruebas químicas después de lo cual se determinó la viabilidad de las mismas.

6.2. Propuesta del método

Para los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad, se propuso un método *in vitro*, usando la línea celular 3T3 de fibroblasto de ratón, utilizando como base el protocolo de *Invitox* N° 44, de fototoxicidad y como producto de prueba se evaluó el compuesto FLS-3 a diferentes concentraciones y se comparó con un producto control.

Para la validación del método, primero se realizaron pruebas de la lámpara, la distancia de la misma, así como los tiempos de exposición. Los parámetros evaluados fueron repetibilidad, reproducibilidad y linealidad donde para ambos ensayos se utilizaron las mismas concentraciones (0.15, 0.30, 12.50, 25.00, 40.00 y 50.00 µg/mL) y 3 repeticiones para cada uno; en el caso de repetibilidad se utilizaron 2 placas/ día, evaluándose en tiempos diferentes y con respecto a la linealidad del método se construyó la curva de regresión y se determinaron el % del coeficiente de variación y el coeficiente de determinación. Cabe mencionar que la evaluación de la citotoxicidad y fototoxicidad del compuesto de prueba FLS-3 y del producto formulado (filtro solar con el FLS-3) fue a las concentraciones anteriormente.

6.2.1 Validación del método de Citotoxicidad.

Se descongelaron las Células 3T3-L1 de ratón del American Type Culture Collection (ATCC), catálogo No. 30-2002, dentro de un baño María a 37° C. Se colocó en un tubo con 10 mL de solución de lavado (medio sin suplementar). Dicha suspensión se centrifuga durante 5 min a 1500 rpm. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 mL de medio de cultivo suplementado. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se colocaron 50 µL de la suspensión de células y 50 µL de solución de azul de tripano, se mezcló perfectamente y transfirieron cuidadosamente 9 µL a cada una de las secciones de la cámara de Neubauer. Se colocó la cámara en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X. Se contaron el número de células teñidas (muertas) por mm². Se hicieron los cálculos correspondientes a la viabilidad y al número de células por mL de suspensión.

Número de células por mL de suspensión:

$$C = \bar{N} \cdot 10^4 \cdot 2 \cdot \text{mL}$$

Donde:

C= células por mililitro.

mL= mililitros de suspensión celular.

\bar{N} = Promedio de células contadas vivas.

10^4 = Factor de conversión de la cámara.

2= Factor de dilución.

Una vez obtenidos estos datos sembrar en las botellas de cultivo de 25 cm² o 75 cm². Se colocaron en Incubadora a 37° C y humedad atmosférica al 5% CO₂/95% aire (Marca: SHEL LAB). Se revisó diariamente para estimar el porcentaje de confluencia (Esta fase ocurre cuando las células del cultivo, que se ha saturado, dejan de dividirse; monocapa: inhibición por contacto) cambiando el medio de cultivo DMEM (Lote: 63844117 Caducidad: Mayo/2017), cada 48 h. Al tener el cultivo entre el 70 y 90% de confluencia se procedió a la tripsinización (Tripsina 0.05% EDTA 0.02%) Manteniendo al menos dos ciclos de confluencia. Si el número de células excedía al requerido para la prueba, las células sobrantes: se colocaba en el criovial 950 µL de la suspensión celular (con al menos 1.5x10⁶ células) y 50 µL de Dimetil sulfóxido (DMSO). Se guardaba en el ultracongelador. Identificando con el nombre de la línea, número de pase, cantidad de células, fecha de congelación e iniciales de la persona que lo realiza.

Tripsinización

Una vez que se obtuvo el cultivo Stock a confluencia se aspiró el medio de cultivo de la caja. Se adicionó 1-3 mL de tripsina–EDTA (Tripsina 0.05% EDTA 0.02%. Se incubó a 37°C hasta que se desprendió la monocapa agitando hasta que al microscopio se observaban las células desprendidas y disgregadas. Se detuvo la reacción de la Tripsina adicionando solución de lavado. Esta suspensión se colocó en un tubo estéril y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos (dependiendo de la muestra a centrifugar). Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en medio de cultivo suplementado. Se realizó la cuantificación

celular como se describe anteriormente (Viabilidad celular) y se sembraron en las placas de 96 pozos (Marca: Costar) de la siguiente manera:

Se preparó una suspensión celular de 1×10^6 células/mL. Se agregaron 20 μL a cada pozo con 100 μL de medio suplementado, para tener 20,000 células/pozo. Se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 con un mínimo de 12 y hasta 24 horas esto en función de que células se hayan adherido a los pozos.

Al término de las 24 horas se aspiró el medio. Se adicionaron 100 μL de cada una de las concentraciones de prueba. Se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Se aspiró el medio y se fijaron las células con 100 μL de ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4°C . Posteriormente se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tinción con Sulforrodamina-B y Lectura. Se adicionaron 50 μL de la solución de Sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% a cada uno de los pozos con células, y se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el exceso de colorante lavando 5 veces con ácido acético al 1%. Se secó a temperatura ambiente. Se solubilizó el colorante celular añadiendo 100 μL de Tris base 10 mM (pH 10.5) dejando reposar por 5 minutos y con agitación mecánica suave hasta que se observó la homogenización del mismo. Se obtuvieron las absorbancias en un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm.

Interpretación de la prueba. Se realizó la determinación del porcentaje de células adheridas al final del experimento, el cual indica el porcentaje de células viables al momento de la fijación. Se consideró la proliferación celular máxima (100%) de los pozos que no reciban tratamiento del compuesto de prueba (control negativo). Para el producto de referencia se determinó la concentración más alta del compuesto al que las células fueron expuestas, en la que no disminuyó la absorbancia comparada con el control.

Se utilizaron 10 diferentes concentraciones, para determinar la concentración en la que no disminuía la absorbancia con respecto al control como se muestra en la Figura 8. Se realizaron las lecturas de absorbancia con un lector de ELISA a 490 nm.



Figura 8. Placa de 96 pozos con la distribución de las concentraciones

6.2.2 Validación del método de Fototoxicidad

Antes de haber realizado la prueba de fototoxicidad, se validó el tiempo de exposición de la placa, para lo cual, se expusieron las células (20,000 células/pozo) sin producto de prueba a diferentes tiempos (10, 15, 20, 30, 40 y 60 minutos) de exposición en la campana, donde se aseguro que había diferencia significativa entre el control y las células expuestas a la luz UV.

Se suspendieron las células en DMEM. Se depositaron 100 µl de la suspensión de células dentro de cada pozo de una placa 96 pozos de microtitulación (es decir 20,000 células/pozo). Se incubaron las placas por 24 h. a 37°C. Al día siguiente se descartó el medio de cultivo y se reemplazó con las concentraciones correspondientes. En la figura 9 se muestra la distribución del control y las diferentes concentraciones evaluadas del producto de referencia.

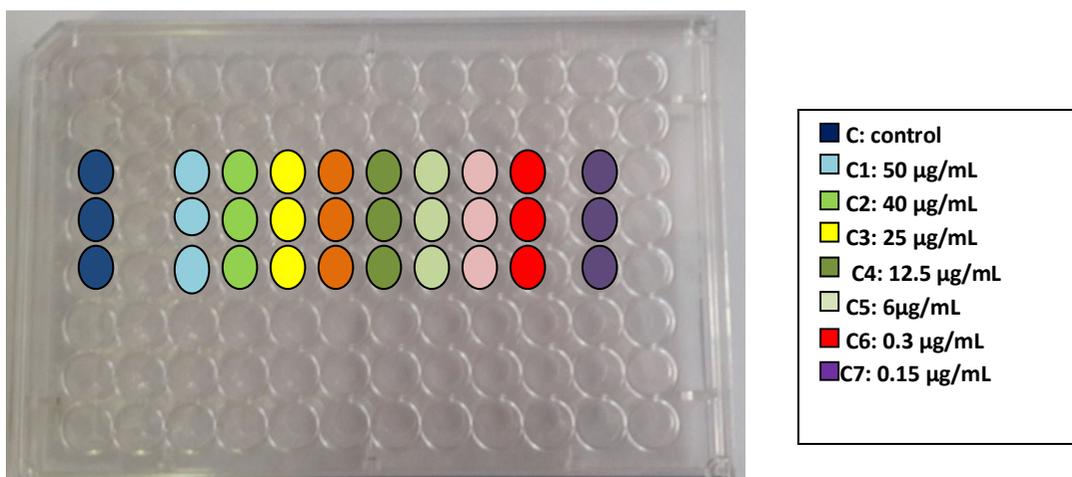


Figura 9. Placa con la distribución de las concentraciones del producto de referencia

Se incubaron las placas por 4 horas para permitir el equilibrio (4 horas han sido establecidas como el periodo mínimo que requiere el compuesto para entrar a la célula como grado suficiente para demostrar fotoactividad).

Exposición a la luz

Después de 4 horas de periodo de equilibrio: Se retiró la tapa de la placa antes de irradiar las células. Se colocó papel aluminio en el control negativo para proteger a las células de la radiación UV. Se expusieron las placas a radiación, durante 20 minutos. En la campana de flujo laminar se colocó la placa a 20 cm de distancia de la lámpara UV (Marca: OSRAM, 15W) Intensidad: 128 luxes, y 10 cm del fondo de la campana, como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Posición de la placa dentro de la campana la cual esta indica con la flecha

Después de exponer a UV, incubaron las células por otras 20 horas a 37°C. Se repitió el ensayo Sulforrodamina como se describe anteriormente.

6.3 Caracterización del compuesto FLS-3

El compuesto FLS-3 fue proporcionado por el Dr. Roberto Martínez del Instituto de Química (patente en proceso). Se revisaron las características organolépticas del FLS-3 como color forma y apariencia, así mismo, se realizaron las pruebas de solubilidad del compuesto

utilizando los solventes acetona y DMSO de acuerdo a la FEUM No. 15, para lo cual se midió el grado de disolución del compuesto en 30 minutos por disolvente a la temperatura de 25° C con agitación vigorosa durante 30 s a intervalos de 5 minutos (Anexo I), siendo el parámetro correspondiente de 1 a 10 partes de disolvente en volumen requeridas por una parte de soluto, para determinar que el compuesto es fácilmente soluble.

6.3.1 Espectros UV

Se realizaron los espectros de luz UV del compuesto utilizando el método general de análisis (MGA) 0361 de la FEUM No. 15. Se prepararon dos soluciones stock de concentración 1 mg/mL del compuesto FLS-3 utilizando como solventes acetona y DMSO para cada solución, de éstas se realizaron las diluciones donde se obtuvieron las concentraciones de 0.0375 mg/mL para acetona y 0.013 mg/mL para DMSO, se midió el blanco y se realizó un barrido de luz UV, con un rango de longitud de onda de 210 a 500 nm utilizando el espectrofotómetro (Marca: Labomed Inc. Espectro UV-Vis Dual Beam 8 Auto Cell).

6.4. Prueba de Citotoxicidad y Fototoxicidad

Para las pruebas de Citotoxicidad y Fototoxicidad del producto de referencia (comercial), compuesto FLS-3 y filtro solar con el compuesto de prueba FLS-3 se utilizaron las metodologías descritas en los puntos (6.2.1 y 6.2.2.), respectivamente.

6.5 Propuesta de la formulación de un filtro solar con el compuesto FLS-3

Se propuso y se evaluó la formulación con el compuesto de prueba FLS-3, la cual consistió en la elaboración de una emulsión aceite/agua con la inserción del compuesto FLS-3 al 1%, la cual consistió en un sistema heterogéneo constituido de dos líquidos no miscibles entre sí en el que la fase dispersa está compuesta de pequeños glóbulos distribuidos en el vehículo en el cual son inmiscibles.

Los excipientes y porcentajes utilizados para la formulación se describen en la Tabla 5, los cuales fueron seleccionados acorde sus propiedades hipoalérgicas y funciones de cada uno., por ejemplo: la glicerina utilizada en cosméticos, esta funciona como humectante; protector de piel; agente acondicionador de la piel, humectante y agente reductor de la viscosidad⁴⁹. Los carbómeros se usan como espesantes, suspensores, dispersantes y agentes emulsificantes, también se utilizan para control reológico⁴⁹.

Tabla 5. Excipientes y % de la formulación del filtro solar propuesta

Excipientes	Porcentaje (%)
Carbómero	5.0
Tween 80	20.0
Aceite de almendras	10.0
Glicerina	5.0
Trietanolamina	5.0
Agua destilada	c.b.p 100

La preparación de la formulación fue la siguiente:

1.- Fase A. En un vaso de precipitados de 1L se colocaron 600 mL de agua destilada, se añadió carbómero (Carbopol 940 a razón de 1 g/20 mL de agua destilada) se mezcló hasta su hidratación.

2.- Fase B. En un vaso de precipitados de 600 mL se colocaron 40 mL de Tween 80, 20 mL de aceite de almendras y 20 mL de glicerina.

3.- Se realizó la incorporación de la fase A en la fase B, con agitación constante a 500 rpm con un homogenizador eléctrico hasta obtener una mezcla homogénea, se adicionó trietanolamina para regular el pH, y posteriormente se adicionó agua cbp.

4.- La mezcla obtenida se dividió en dos porciones, la primera se utilizó como control y la segunda se le añadió el compuesto de prueba al 1%.

En las siguientes figuras se muestran los diagramas de flujo para las pruebas de citotoxicidad y fototoxicidad (Figura 11) y elaboración del filtro base y del filtro con FLS-3 al 1% (Figura 12) respectivamente.

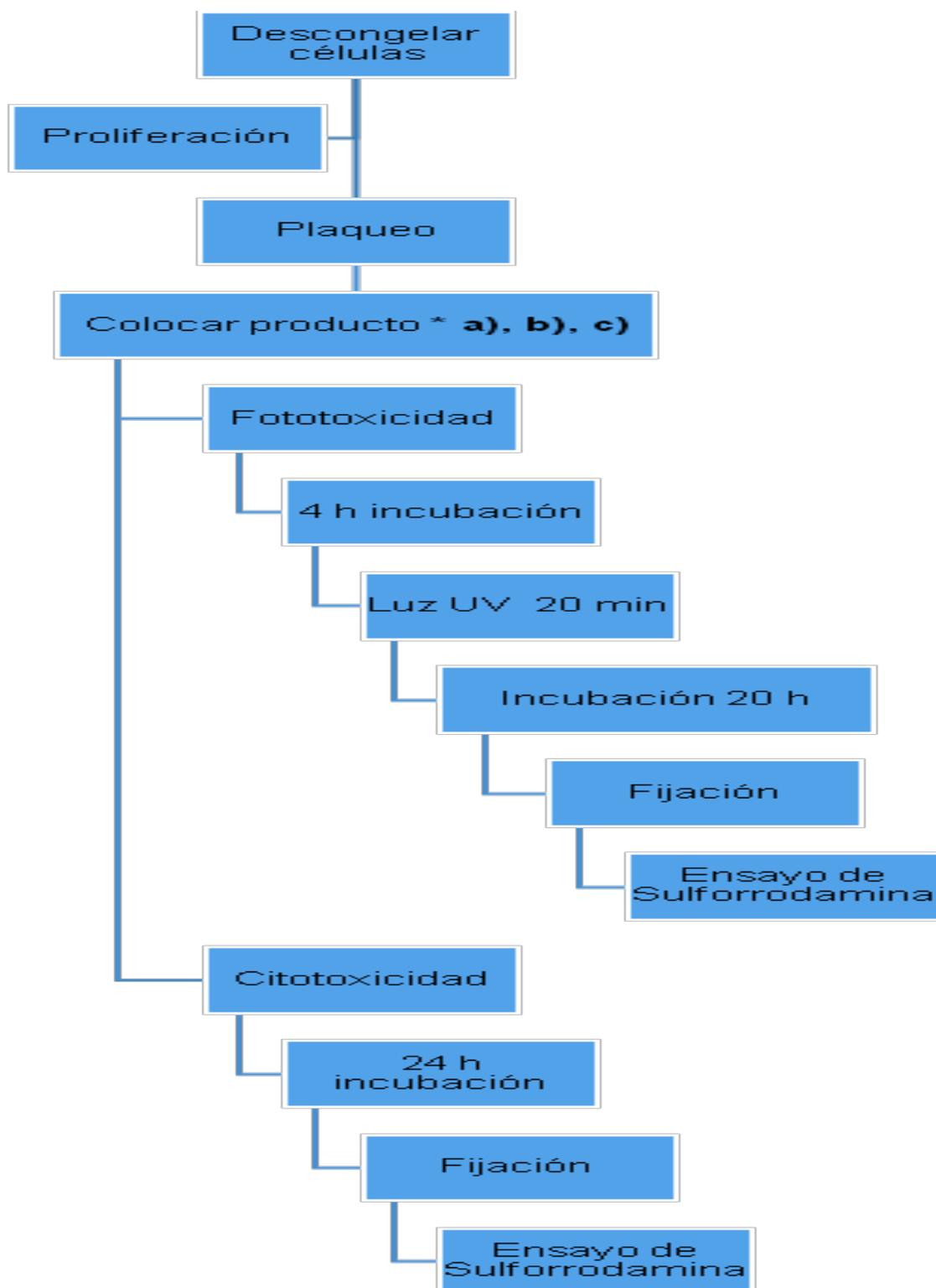


Figura 11. Diagrama de flujo para las pruebas de Citotoxicidad y Fototoxicidad* donde:
 a) FLS-3; b) producto de prueba y/o c) producto de referencia.

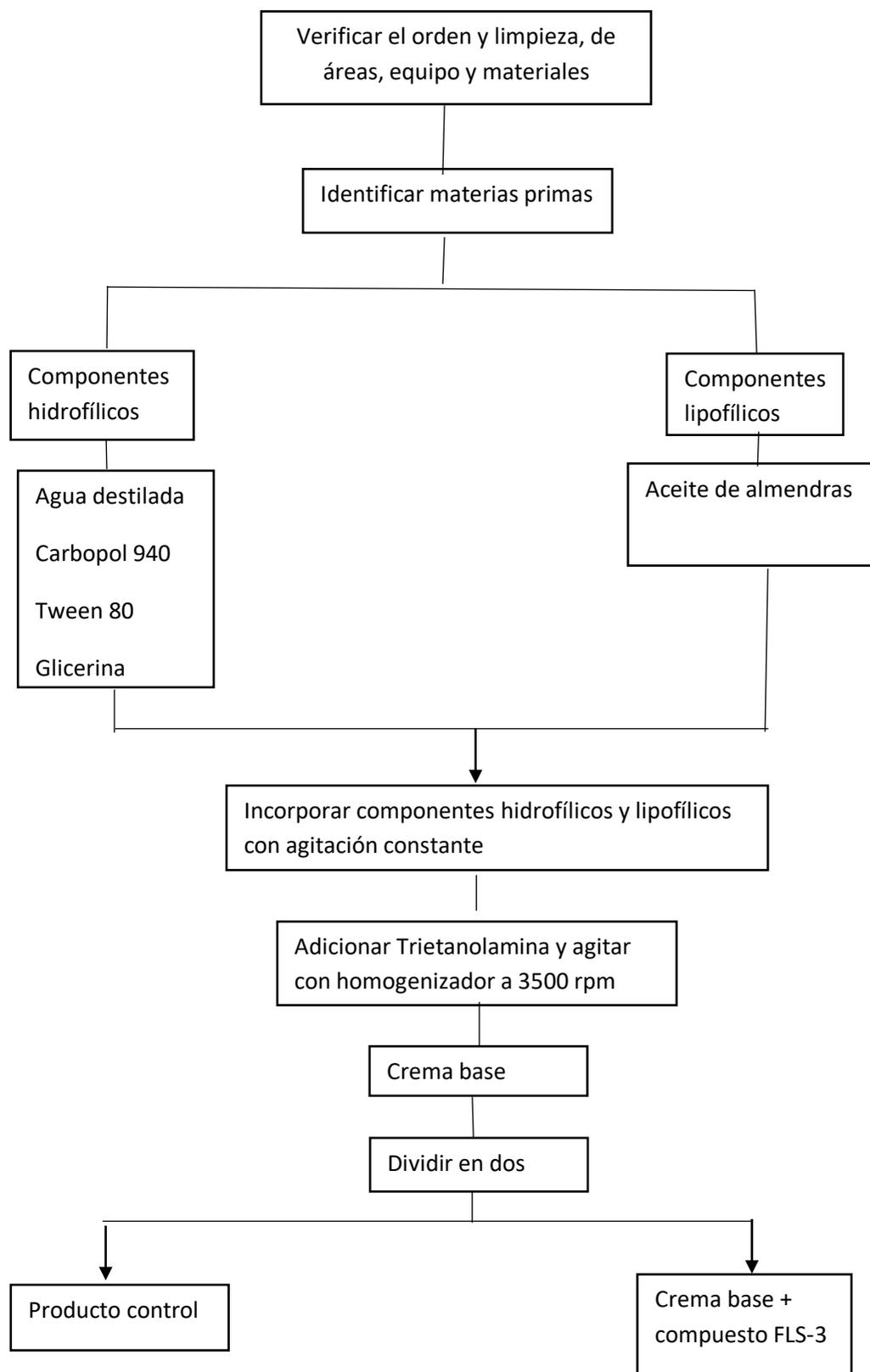


Figura 12. Diagrama de flujo de la elaboración del filtro base y del filtro que contiene el compuesto FLS-3.

6.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de todos los resultados obtenidos tanto para la validación de los ensayos de citotoxicidad y fototoxicidad, así como para la determinación del potencial fototóxico del FLS-3 se utilizó el programa Sigma plot versión 13[®]. Las pruebas realizadas Anadeva de una vía o Kruskal-Wallis fueron en función de si los datos cumplieron con la prueba de normalidad y equivarianza, cuando la p fue <0.05, se realizó la prueba *post-hoc*: Tukey.

7. Resultados

7.1. Atributos del compuesto FLS-3

En la Tabla 6, se muestran los atributos del compuesto FLS-3, así como los resultados obtenidos de solubilidad y pH.

Tabla 6. Atributos FLS-3.

Especificaciones del compuesto FLS-3	Descripción
Color	Amarillo
Olor	Inodoro
Apariencia	Polvo fino, homogéneo sin partículas extrañas visibles
Solubilidad	Fácilmente soluble con DMSO Soluble en caliente con acetona
pH	7.0

7.2 Validación

Se realizó la validación de los métodos citotoxicidad y fototoxicidad para el filtro comercial, el compuesto de prueba y la formulación, para ello se midieron los parámetros de repetibilidad, reproducibilidad y linealidad.

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos de porcentaje de viabilidad para repetibilidad, la cual fue calculada mediante el análisis de 3 muestras, preparadas a la misma concentración el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales; en las concentraciones 25 y 50 µg/mL, se observan porcentajes de viabilidad similares, por lo que sus porcentajes de coeficiente de variación (%C.V.) fueron menores a 20% siendo muy baja la dispersión con respecto a su media, mientras que en la placa 2 los coeficientes de variación de las placas, en la concentración de 0.15 y 50 µg/mL, se observan que los coeficientes de variación % C.V. ≤20, dicho valor de %C.V. es aceptado en ensayos biológicos de acuerdo a la guía ICH Q2 (R1).

Tabla 7. Repetibilidad. Citotoxicidad del compuesto FLS-3

% Viabilidad						
Repetición	Placa 1			Placa 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	25.00	50.00	0.15	25.00	50.00
1	87.67	43.66	58.56	72.98	41.02	46.01
2	42.27	40.43	44.01	100.86	42.84	54.28
3	87.21	44.47	47.59	85.11	56.55	64.82
Promedio	72.39	42.85	50.05	86.32	46.81	55.04
D.E.	26.07	2.13	7.58	13.97	8.48	9.42
%CV	36.02	4.99	15.15	16.19	18.14	17.13

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de (porcentaje de viabilidad) de Fototoxicidad, para la repetibilidad, la cual fue calculada mediante el análisis de 3 muestras preparadas a la misma concentración el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales; en donde se muestra que para la placa uno, en las concentraciones 25 y 50 µg/mL, los porcentajes de viabilidad de células son similares, por lo que sus % C.V. fueron menores a 25%, dicho valor de coeficiente de variación es aceptado en estudios de Fototoxicidad, de acuerdo a *Invitox* N°44; la dispersión es muy baja con respecto a su media, mientras que en la placa 2 a las concentraciones de 0.15, 12.50 y 50 µg/mL, se observan % C.V.≤25, mientras que su dispersión con respecto a la media es muy baja.

Tabla 8. Repetibilidad. Fototoxicidad del compuesto de prueba FLS-3.

%Viabilidad						
Repetición	Placa 1			Placa 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	25.00	50.00	0.15	25.00	50.00
1	56.47	71.81	64.96	65.62	108.48	79.68
2	58.28	116.86	78.01	95.75	89.73	76.33
3	62.73	110.66	83.24	108.48	73.66	77.00
Promedio	59.16	99.78	75.40	89.95	90.62	77.67
D.E.	3.22	24.41	9.41	22.01	17.42	1.77
%CV	5.45	24.46	12.48	24.46	19.23	2.28

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para repetibilidad, de la formulación, la cual fue calculada mediante el análisis de 3 muestras, preparadas a la misma concentración el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales; para ello se consideraron valores de diferentes placas, en la concentración de 0.15 µg/mL, se observan porcentaje de viabilidad similares, por lo que su % de C.V.≤20, dicho coeficiente de variación se acepta en ensayos biológicos de acuerdo a la guía ICH Q2 (R1) en cuanto a las concentraciones de 12.5 y 50 µg/mL, en la placa 2, presenta porcentaje de %C.V.≤20, en cuanto la dispersión son valores bajos con respecto a la media.

Tabla 9. Repetibilidad de la Citotoxicidad formulación que contiene el compuesto FLS-3.

%Viabilidad						
Repetición	Placa 1			Placa 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	12.50	50.00	0.15	12.50	50.00
1	67.50	46.33	42.55	64.95	82.24	91.58
2	99.21	63.43	53.40	84.01	92.21	103.27
3	94.34	83.66	71.85	86.89	90.34	97.93
Promedio	87.02	64.47	55.93	78.62	88.26	97.59
D.E.	17.07	18.69	14.81	11.92	5.29	5.85
%CV	19.62	28.98	26.48	15.16	6.00	5.99

En la repetibilidad de fototoxicidad para la formulación que contiene el compuesto FLS-3 (Tabla 10), la cual fue calculada mediante el análisis de 3 muestras, preparadas a la misma concentración el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales; se observa en ambas placas coeficientes de variación %C.V.≤25, dicho valor es aceptado en estudios de fototoxicidad (*Invitox* N°44), en cuanto a la dispersión de los datos, es muy baja con respecto a la media.

Tabla 10. Repetibilidad de la Fototoxicidad de la formulación.

%Viabilidad						
Repetición	Placa 1			Placa 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	12.50	50.00	0.15	12.50	40.00
1	56.47	57.54	59.25	48.73	125.94	132.27
2	58.28	61.02	79.55	35.44	83.72	81.00
3	62.73	74.46	65.46	59.77	134.07	111.73
Promedio	59.16	64.34	68.09	47.98	114.58	108.33
D.E.	3.22	8.93	10.39	12.18	27.034	25.80
%CV	5.45	13.88	15.27	25.39	23.59	23.81

En la Tabla 11 se muestra la reproducibilidad en citotoxicidad, la cual se obtuvo con la comparación de resultados de diferentes días de trabajo; en la placa 1, para las concentraciones de 25 y 50 µg/mL, se observan porcentaje de C.V.≤20, dicho valor es aceptado en ensayos bioanalíticos de acuerdo a la guía ICH Q2 (R1); en cuanto a la concentración 0.15 µg/mL donde él %C.V.= 25.35, se encuentra dentro del límite superior. En la placa 2 para las concentraciones de 0.15, 25 y 50 µg/mL, se obtuvo un % de C.V.≤20, y se obtuvo una dispersión baja con respecto a la media.

Tabla 11. Reproducibilidad de citotoxicidad del compuesto FLS-3.

%Viabilidad						
Repetición	Día 1			Día 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	25.00	50.00	0.15	25.00	50.00
1	173.30	89.19	142.35	66.09	90.46	101.71
2	292.71	80.09	106.31	75.46	115.78	84.84
3	246.48	81.18	103.76	73.12	103.59	94.21
Promedio	237.5	83.49	117.47	71.56	103.28	93.59
D.E.	60.21	4.96	21.58	4.87	12.65	8.45
%CV	25.35	5.95	18.37	6.81	12.25	9.03

La reproducibilidad de la fototoxicidad del compuesto FLS-3 (Tabla 12), se obtuvo comparando ensayos de diferentes días, se puede observar en el día 1, a concentraciones de 15, 25 y 50 µg/mL coeficiente de variación (% C.V.) ≤25, dicho valor es aceptado en estudios de fototoxicidad, en el día 2 se obtuvieron % C.V.≤25 para las concentraciones 15, 25 y 50 µg/mL.

Tabla 12. Reproducibilidad. Fototoxicidad compuesto FLS-3.

%Viabilidad						
Repetición	Día 1			Día 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	25.00	50.00	0.15	25.00	50.00
1	65.62	108.48	79.68	48.58	48.44	60.02
2	95.75	89.73	76.33	44.85	55.23	63.08
3	108.48	73.66	77.01	37.26	36.06	62.28
Promedio	89.95	90.62	77.67	43.56	46.58	61.80
D.E.	22.01	17.42	1.77	5.76	9.71	1.58
%CV	24.46	19.23	2.28	13.23	20.86	2.56

La reproducibilidad de la citotoxicidad de la formulación (Tabla 13), la cual se obtuvo con datos de diferentes días, la placa 1, para las concentraciones de 0.15, 12.5 y 25 µg/mL, presentaron porcentaje de viabilidad similares, por lo que su porcentaje de coeficiente de variación(%C.V.) ≤ 20 ; en cuanto a la placa 2, en la concentración de 50 µg/mL, se puede observar porcentajes de viabilidad similares, por lo que el valor % de C.V. ≤ 20 , dicho valor se acepta en ensayos bioanalíticos de acuerdo a la guía ICH Q2 (R1).

Tabla 13. Reproducibilidad Citotoxicidad de la formulación

%Viabilidad						
Repetición	Día 1			Día 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	12.50	25.00	0.15	12.50	50.00
1	64.95	82.24	100.46	112.06	146.5	99.13
2	84.01	92.21	80.73	65.69	88.02	81.22
3	86.89	90.34	83.79	90.34	97.58	104.13
Promedio	78.62	88.26	88.33	89.36	110.72	94.83
D.E.	11.92	5.29	10.61	23.20	31.39	12.04
%CV	15.16	6.00	12.02	25.96	28.35	12.70

En la Tabla 14 se muestra la reproducibilidad del ensayo de fototoxicidad de la formulación, el cual se obtuvo a partir de datos de días diferentes de trabajo, en ambos días en las concentraciones de 0.150, 12.50 y 50 µg/mL una semejanza en el porcentaje de viabilidad celular, por lo que se obtuvo un porcentaje de C.V. ≤25, dicho valor de porcentaje de C.V. se acepta para ensayos de Fototoxicidad de acuerdo al protocolo *Invitox* N°44, del EURL-ECVAM.

Tabla 14. Reproducibilidad fototoxicidad de la formulación.

%Viabilidad						
Repetición	Día 1			Día 2		
	Concentración (µg/mL)			Concentración (µg/mL)		
	0.15	12.50	50.00	0.15	12.50	50.00
1	37.16	57.54	59.25	64.66	125.94	93.27
2	27.76	61.02	79.55	58.46	83.72	97.81
3	45.69	74.46	65.46	70.86	134.07	61.00
Promedio	36.87	64.34	68.09	64.66	114.58	84.03
D.E.	8.96	8.93	10.39	6.19	27.03	20.06
% CV	24.31	13.88	15.27	9.58	23.59	23.88

En la Figura 13 se muestra la gráfica de porcentaje de viabilidad en función de las concentraciones del compuesto de prueba FLS-3, en donde se muestra la linealidad, con una regresión tipo polinomial, esta fue calculada con diferentes concentraciones, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9989 para el compuesto de prueba, lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables, donde se observa que a mayor concentración se presenta una tendencia lineal.

FSL-3

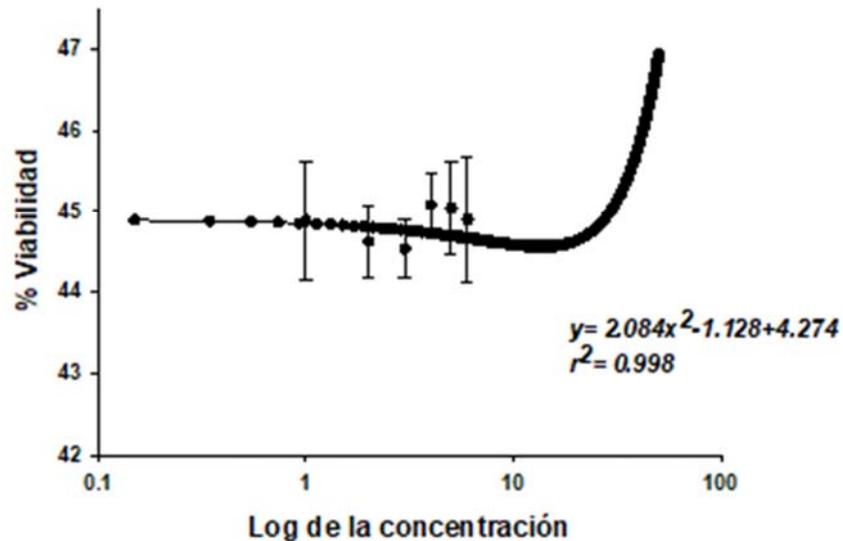


Figura 13. % de viabilidad Vs. Log Concentración del producto del compuesto de FSL-3. Regresión cuadrática ($f=y_0+a*x+b*x^2$). Cada representa el promedio del % de viabilidad de las células \pm E.E, para el log de las concentraciones del FSL-3 (0.15, 0.30, 12.5, 25 y 50 μ g/mL). $R^2=0.998$.

En la Figura 14 se muestra el ajuste de la curva (prueba de linealidad) del porcentaje de viabilidad Vs. Log Concentración de la formulación del producto de prueba (crema con el compuesto FLS-3), donde el coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue de 0.9859, encontrándose una tendencia lineal entre ambas variables.

Filtro + FSL3

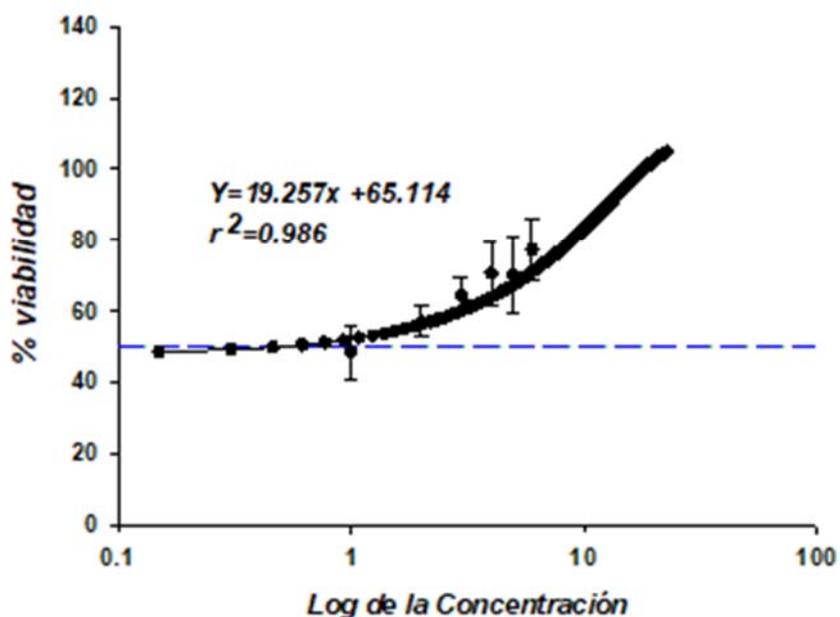


Figura 14. Filtro + compuesto FLS-3. % de viabilidad Vs. Log Concentración del producto. Regresión lineal. ($f=y_0+a$). Cada punto representa el promedio del % de viabilidad de las células \pm E.E, para el log de las concentraciones del producto formulado (0.15, 0.30, 12.5, 25 y 50 μ g/mL). $R^2=0.986$.

7.3. Espectros UV

En la Tabla 15 se muestra el barrido de luz UV, utilizando una concentración de 0.0375 mg/mL del producto de prueba FLS-3 disuelto en acetona, utilizando como blanco el mismo solvente. En la solución se obtuvo una absorbancia en una longitud de onda correspondiente al rango de rayos UVB (280-320 nm).

Tabla 15. Absorbancia del compuesto FLS-3 del barrido de luz UV

Cresta/Valle	Longitud de onda(nm)	Absorbancia
Cresta	345.00	1.849
Valle	305.00	0.004

En la Figura 15 se muestra el espectro de luz UV utilizando como solvente acetona, en dicho espectro se puede observar dos picos en las longitudes de onda que corresponden al rango de la región UVB (280-320 nm).

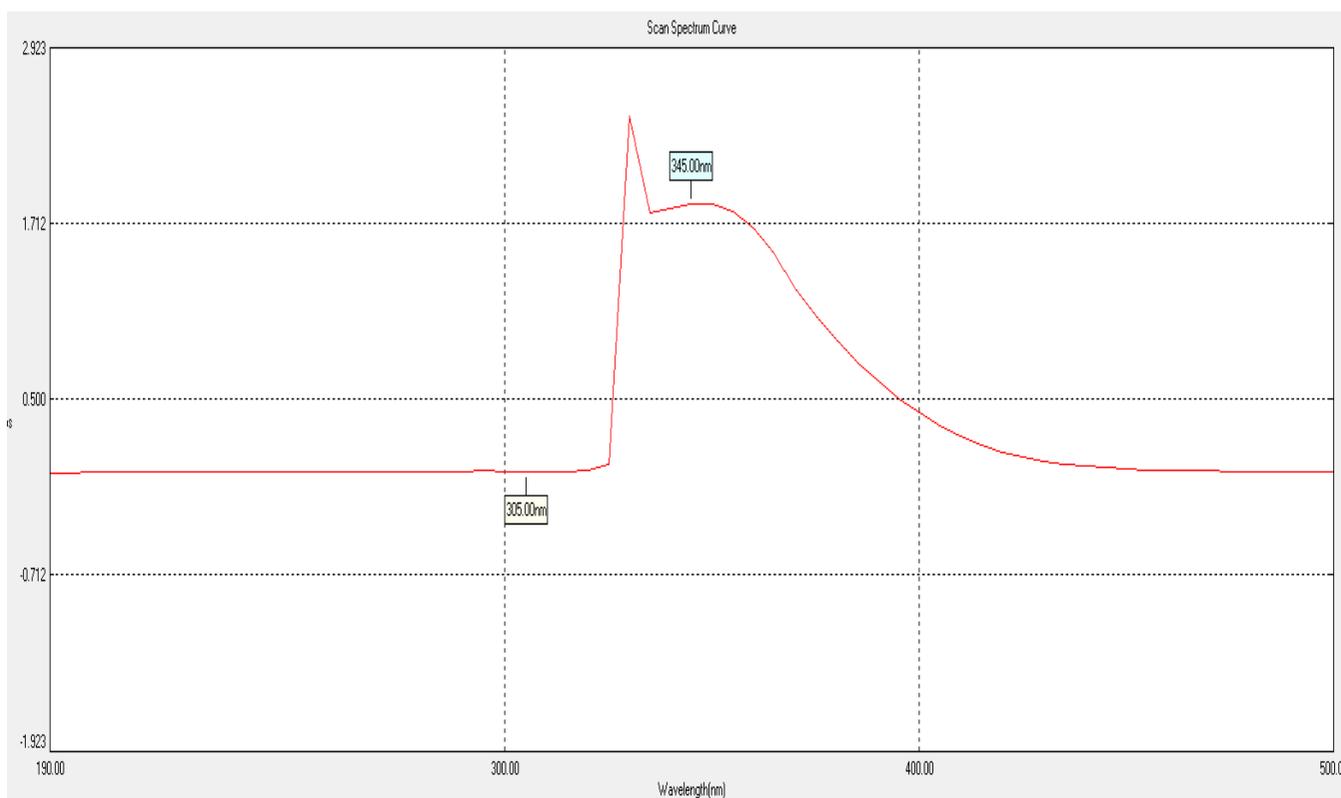


Figura 15. Espectro de Luz UV del compuesto FLS-3 con acetona, medido en espectrofotómetro (Marca: Labomed, Inc. Espectro UV-Vis Dual Beam 8 Auto Cell).

En la Tabla 16 se muestran los valores de absorbancia del espectro obtenido utilizando como solvente DMSO.

Tabla 16. Absorbancias del espectro de luz UV con DMSO

Cresta/Valle	Longitud de onda (nm)	Absorbancia
Cresta	355	0.5666
Cresta	290	0.540
Valle	310	0.293
Valle	215	0.001

En la Figura 16 se muestra el espectro de luz UV del compuesto utilizando como solvente DMSO, utilizando una concentración de 0.013 mg/mL del producto de prueba FLS-3, se pueden observar dos picos en 290 y 355 nm, longitudes que se encuentran en el rango de UVB.

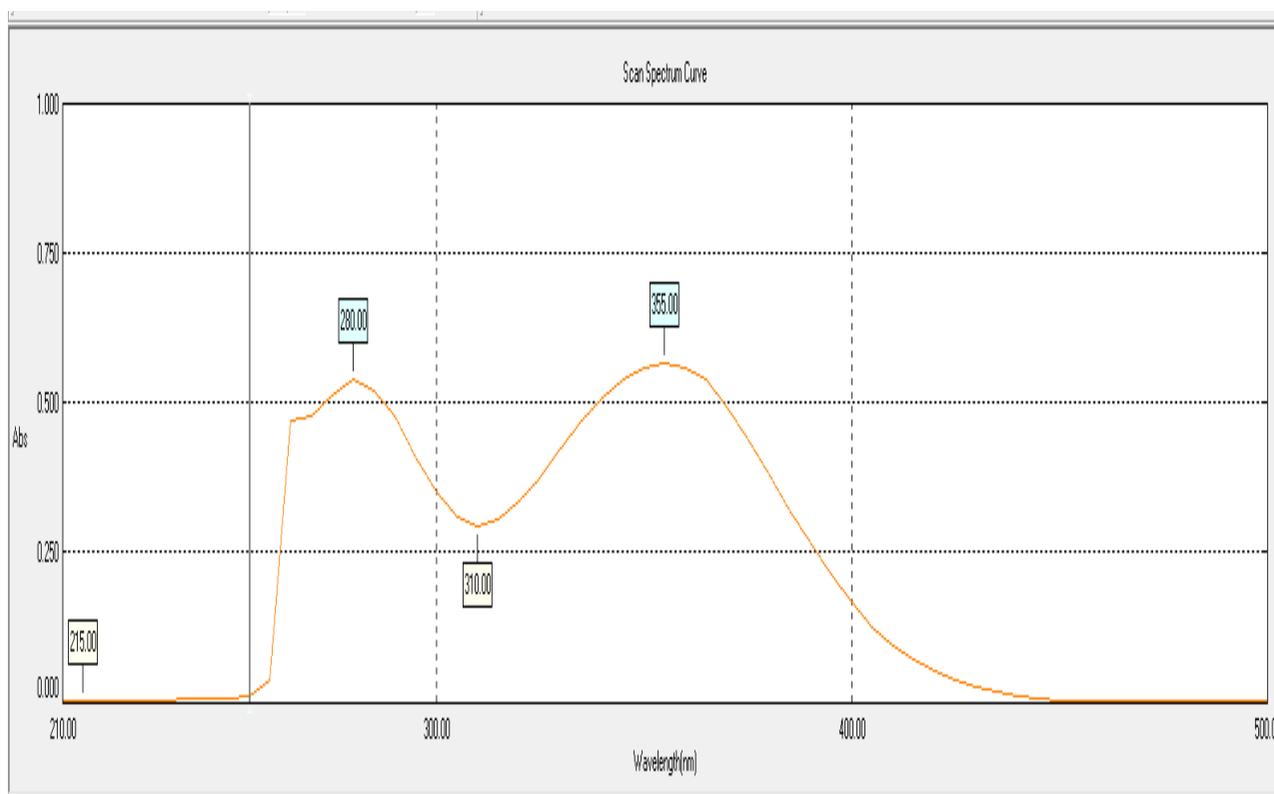


Figura 16. Espectro de Luz UV del compuesto FLS-3 con DMSO medido en espectrofotómetro (Marca: Labomed, Inc. Espectro UV-Vis Dual Beam 8 Auto Cell).

7.4 Citotoxicidad y Fototoxicidad del producto de prueba

7.4.1 Citotoxicidad del producto de prueba

En la Figura 17 se muestran los resultados de citotoxicidad, donde se observa el porcentaje de viabilidad de células 3T3 a las concentraciones (0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) evaluadas del producto de prueba FLS-3, donde se muestra que no hubo diferencias con respecto al grupo control (sin compuesto de prueba) presentándose tendencias similares, así mismo, no hubo diferencia con respecto al aumento de las concentraciones; debido a que presentan un comportamiento similar al control, puede decirse que el compuesto no es citotóxico (ANADEVA de una vía, $H_{g,l}=6$; $0.05=7.279$; $p>0.05$, n.s.).

Citotoxicidad del compuesto de prueba

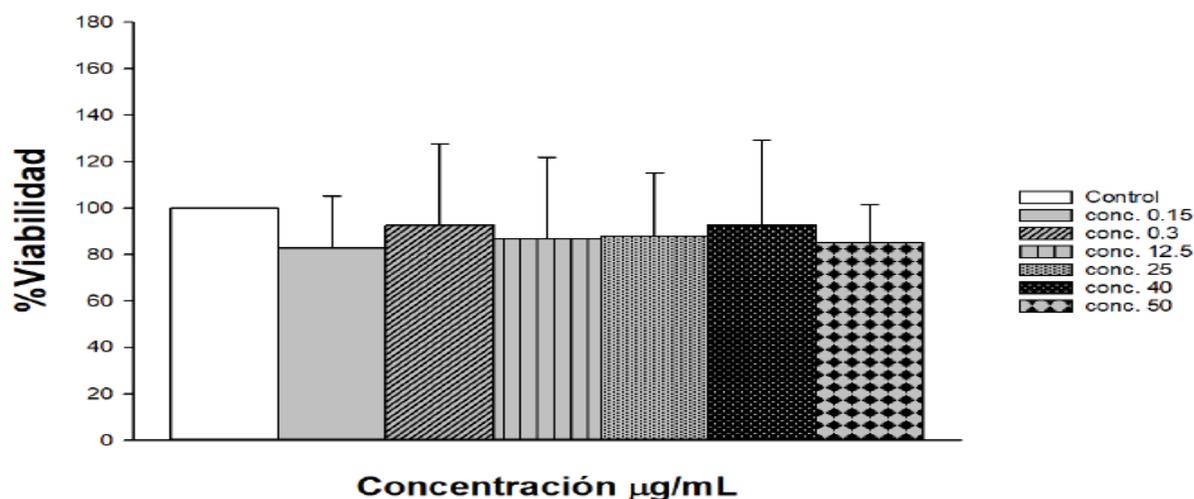


Figura 17. Citotoxicidad del compuesto de prueba FLS-3. Cada barra muestra el % de viabilidad de las células 3T3L \pm D.E. para el Control negativo (sin compuesto de prueba) y compuesto de prueba FLS-3 a las concentraciones 0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. n.s a $p>0.05$.

7.4.2 Fototoxicidad del producto de prueba

En la Figura 18 se presenta la gráfica de Fototoxicidad del compuesto de prueba FLS-3, donde se muestra el porcentaje de viabilidad de las células 3T3 para las diferentes concentraciones del principio activo (0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$), donde se observa que hay diferencias significativas del control negativo con todas las concentraciones evaluadas, (ANDEVA de una vía, $H_{g,l}=7; 0.05=28.904; p<0.001$ n.s.).

Fototoxicidad Compuesto de prueba

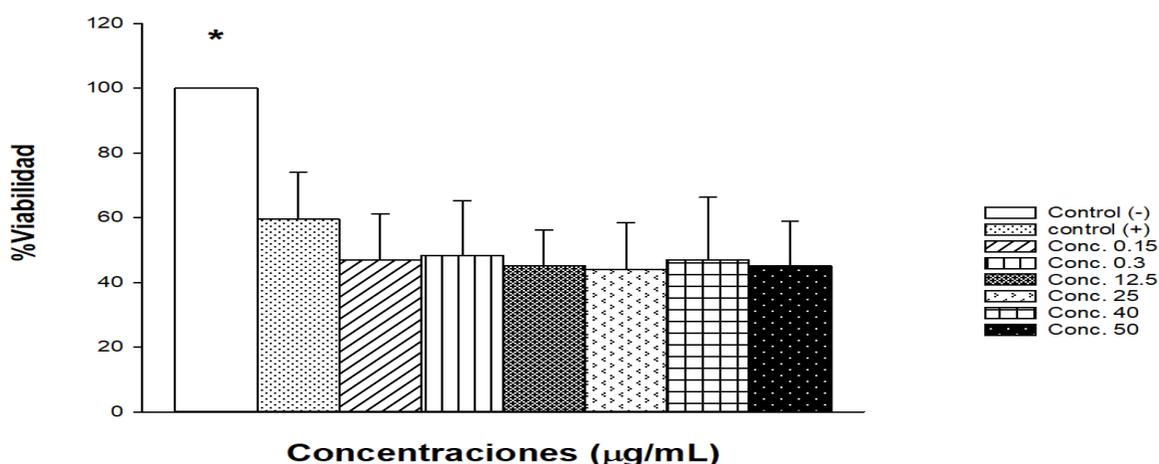


Figura 18. Fototoxicidad del compuesto de prueba FLS-3. Cada barra muestra el % de viabilidad de la células 3T3L \pm D.E. para el Control negativo (-): sin exposición de UV, Control positivo (+): exposición directa de la luz UV sin el FLS-3, y el producto de prueba FLS-3 a las concentraciones: 0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. *Diferencias significativas Ctrl(-) Vs. Conc. 12.50, 0.15, 0.30, 25, 40 y 50, $\mu\text{g/mL}$.

7.5 Formulación

Con respecto a la inclusión del producto de prueba en una matriz, se realizó una formulación, de emulsión o/w (70/30), conteniendo los ingredientes siguientes y cuya función en dicha formulación se indica en la Tabla 17.

Tabla 17. Funciones de los excipientes de la formulación

Excipiente	Función	Porcentaje (%)
Carbómero	Agente emulsificante/ viscosante	5.0
Tween 80	Agente tensoactivo Emulsificante O/W	20.0
Aceite de almendras	Emoliente	10.0
Glicerina	Humectante	5.0
Trietanolamina	Ajustador de pH	~5.0
Agua destilada	Vehículo (cbp)	100.0

7.5.1 Productos control y prueba

Las formulaciones tanto del producto de prueba FLS-3 al 1%, así como del control fueron homogéneos, oclusivos y agradables al tacto, la coloración para la formulación con el FLS-3 fue de color amarillo y para el control fue blanca como se muestra en la Figura 19, por otro lado, los parámetros propuestos para ambas formulaciones, así como los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18, donde para ambas formulaciones cumplieron los respectivos parámetros establecidos.

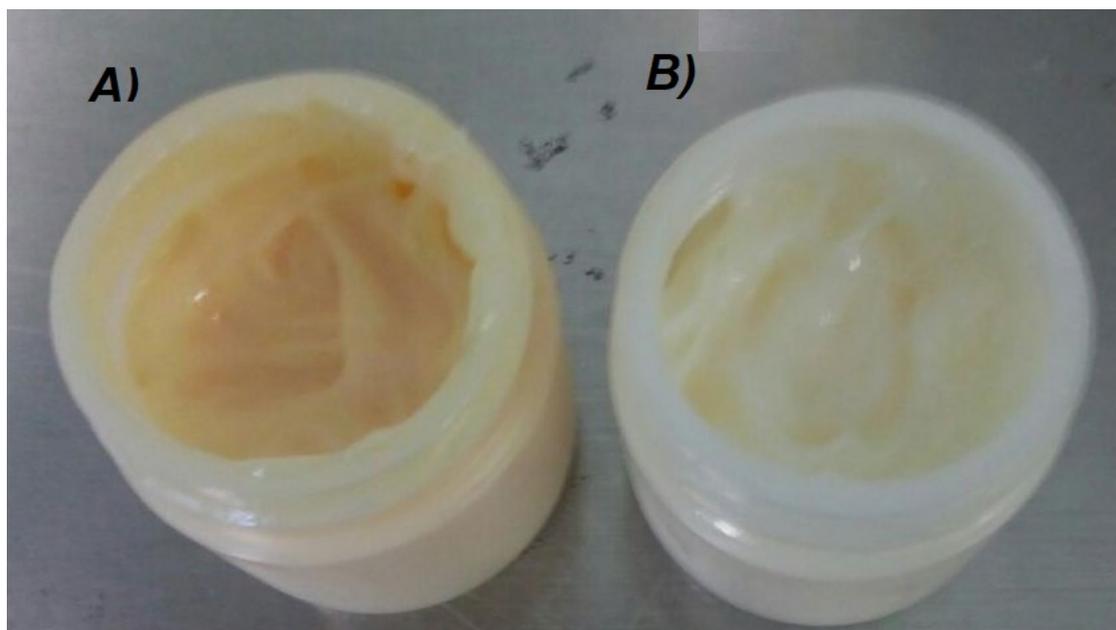


Figura 19. A) Producto con el compuesto de prueba FLS-3 al 1 % y B) Producto base.

Tabla 18. Especificaciones de la formulación base y con el producto de prueba FLS-3 al 1%.

Formulación Base			
Especificaciones de la emulsión base		Resultado	Criterio de aceptación
Color	Blanco	Blanco	Cumple
Olor	Sin aroma	Sin aroma	Cumple
Apariencia	Semisólido homogéneo	Semisólido homogéneo	Cumple
Textura	Suave al tacto	Suave al tacto	Cumple
Viscosidad (cP)	6000-8500 cP	8180 cP	Cumple
pH	6-7	7	Cumple
Ciclado	Estable a temperatura ambiente y a -5°C	Estable en ambas temperaturas	Cumple
Formulación con el producto FLS-3 al 1%			
Especificaciones del producto de prueba		Resultado	Criterio de aceptación
Color	Amarillo	Amarillo	Cumple
Olor	Sin aroma	Sin aroma	Cumple
Apariencia	Semisólido homogéneo	Semisólido homogéneo	Cumple
Textura	Suave al tacto	Suave al tacto	Cumple
Viscosidad (cP)	6000-8500 cP	6020 cP	Cumple
pH	6-7	7	Cumple
Ciclado	Estable a temperatura ambiente y a -5°C	Estable en ambas temperaturas	Cumple

7.5.2 Citotoxicidad del producto de prueba con el compuesto FLS-3

En la figura 20 se muestra la citotoxicidad del producto de prueba, donde se graficó el % de viabilidad de las células 3T3 a diferentes concentraciones (0.15, 0.30, 12.50, 25 y 50 µg/mL) del producto de prueba (ANDEVA de una vía, $F_{20, 0.05}=2.459$; $p=0.078$). No se encontraron diferencias significativas con las concentraciones 0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 µg/mL del producto de prueba.

Citotoxicidad filtro prueba

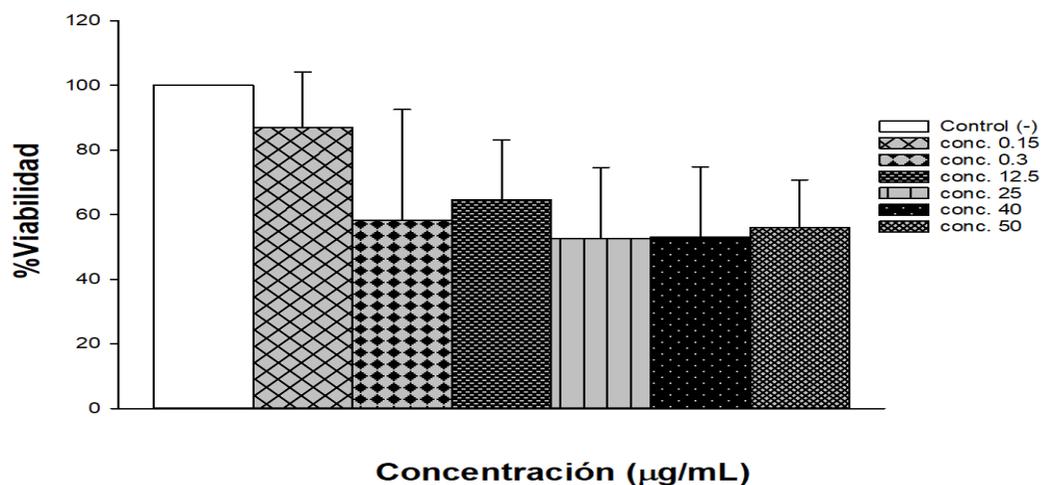


Figura 20. Citotoxicidad de la formulación con el compuesto FLS-3 al 1%. Cada barra representa el promedio del porcentaje de viabilidad de las células 3T3 \pm D.E. para los grupos: Control negativo (-) y producto formulado a las concentraciones: 0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. n.s. a $p > 0.05$.

7.5.3 Fototoxicidad producto de prueba con el compuesto FLS-3

En la Figura 21 se muestra la evaluación de fototoxicidad del producto de prueba, donde se muestra el porcentaje de viabilidad de las células 3T3 con la adición de diferentes concentraciones del producto formulado (0.15, 0.30, 12.50, 25, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$), control positivo (+) y control negativo (-) donde las diferencias encontradas corresponden al control (-) Vs. Control (+), formulación base y la concentración del producto formulado con FLS-3 a 0.15 $\mu\text{g/mL}$ (ANDEVA de una vía; $F_{53, 0.05} = 3.770$; $p = 0.002$), sin embargo, en relación a la comparación entre el control (-) el cual no fue expuesto a la luz con respecto a las demás concentraciones evaluadas no se encontró diferencias, observándose % de viabilidad por arriba del 80%, por lo a estas concentraciones este producto presenta propiedades fotoprotectoras, cabe mencionar que en relación a la comparación con la Figura 14 donde el compuesto FLS-3 se evaluó de forma individual y que no hubo diferencias significativas, este efecto encontrado se puede atribuir un efecto sinérgico una vez contenido en fase oleosa.

Fototoxicidad filtro de prueba

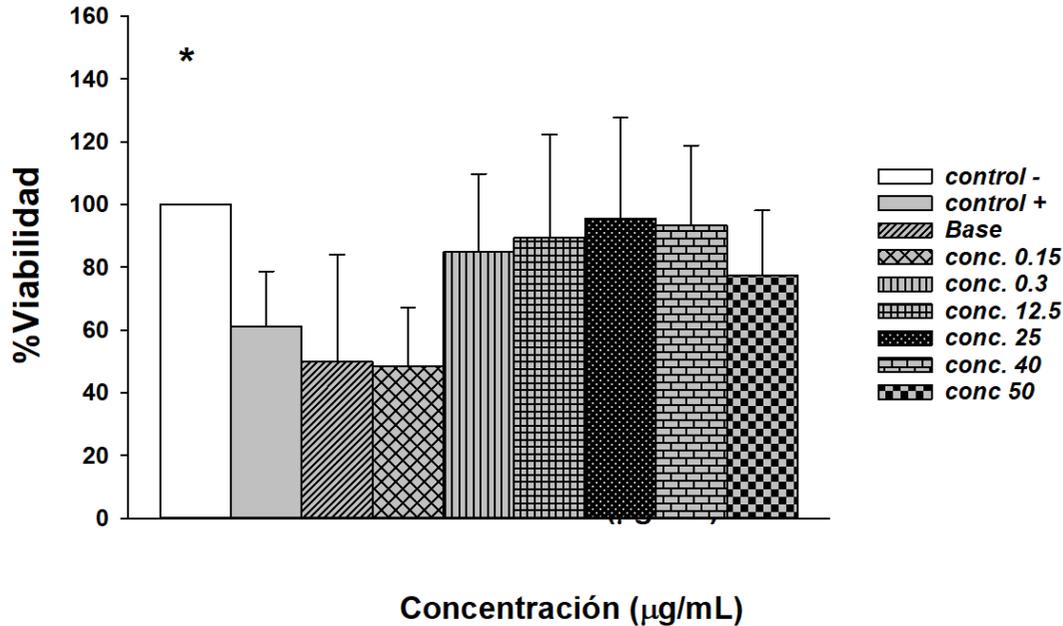


Figura 21. Fototoxicidad de la formulación con el compuesto FLS-3 al 1%. Cada barra representa el promedio de % de viabilidad de las células 3T3 \pm D.E., para los grupos: Control (-), Control (+), producto formulado al 1% a las concentraciones 0.15, 0.30, 12.50, 25, 40, 50 μ g/mL. *Diferencias significativas a $p < 0.05$ entre el Control (-) Vs. Control (+), formulación base y la concentración del producto formulado con FLS-3 a 0.15 μ g/mL.

7.6 Comparación con el producto comercial

7.6.1 Citotoxicidad del producto comercial

El producto comercial utilizado fue una loción protectora solar: Hawaiian Tropic Ozone[®], producto de color blanco con olor característico, fácilmente deslizante, suave al tacto y consistencia ligera. Este producto fue evaluado igual que el producto con FLS-3 al 1% desarrollado, donde los resultados de la evaluación de citotoxicidad para este producto comercial muestran, que no es citotóxico como se observa en la Figura 22, donde el % de viabilidad de las células 3T3, en función de las concentraciones evaluadas (0.15, 0.3, 12.5, 25, 40 y 50 μ g/mL) son similares al control negativo (C-), no encontrándose diferencias significativas (ANDEVA de una vía, Hg.l.=6; 0.05=2.493; n.s. a $p > 0.050$).

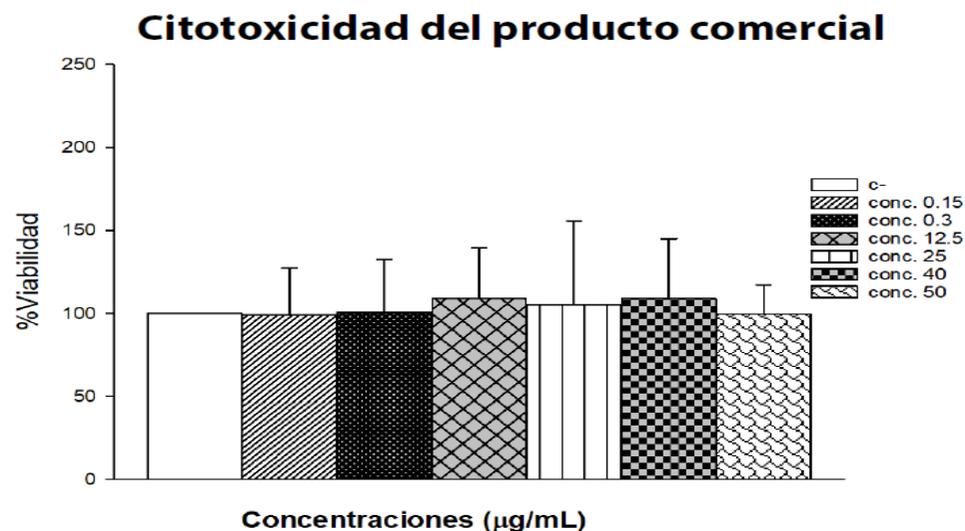


Figura 22. Citotoxicidad del producto comercial. Cada barra representa el % de viabilidad de las células 3T3± D.E., para los grupos: Control negativo (C-) y producto comercial a las concentraciones: 0.15, 0.3, 12.5, 25, 40 y 50 µg/mL n.s.; p>0.050.

7.6.2 Fototoxicidad del producto comercial

Con respecto a la fototoxicidad del producto comercial, se observa que el % de viabilidad de las células 3T3 en función de las concentraciones evaluadas del producto comercial (0.15, 0.3, 12.5, 25, 40, 50 µg/mL) disminuyó por debajo del 50% de viabilidad en todos los grupos. Las diferencias fueron significativas entre el control negativo (100% de viabilidad), comparado con las concentraciones 0.3, 12.5, 25, 40 y 50 µg/mL del producto comercial, por lo que a estas concentraciones el filtro solar no protege a las células contra la radiación UV, como se muestra en la Figura 23 (ANDEVA de una vía $H_{g,l}=7; 0.05=33.853; p<0.001$).

Fototoxicidad del producto comercial

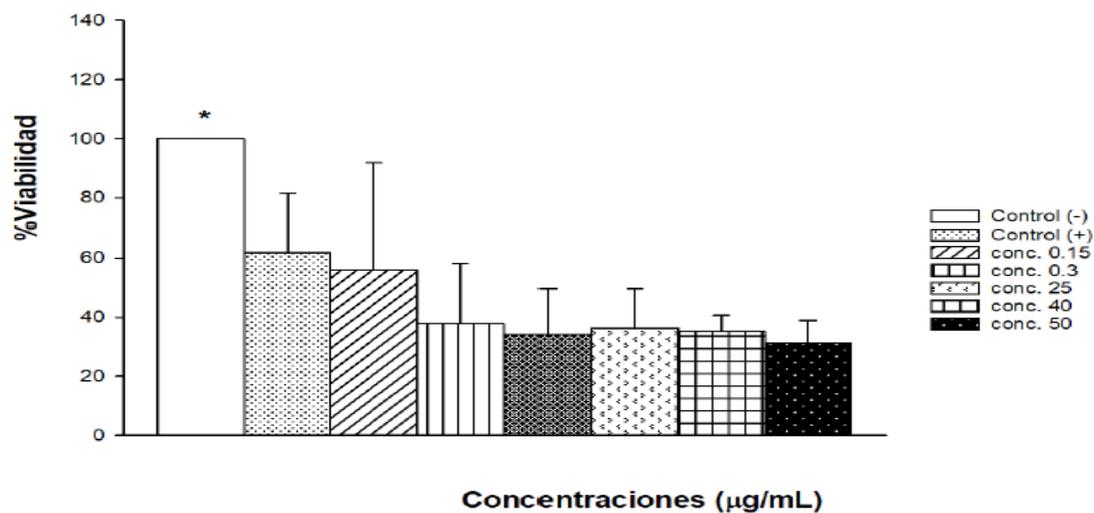


Figura 23. Fototoxicidad del producto comercial. Cada barra representa el promedio del % de viabilidad de las células 3T3 \pm D.E, para los grupos: Control (-), Control (+) y las concentraciones del producto comercial a las concentraciones: 0.15, 0.3, 25, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$. *Diferencias significativas a $p < 0.05$ entre el Control (-) Vs. 0.3, 12.5, 25, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$.

8. Análisis de resultados

Se realizaron pruebas piloto, para determinar el tiempo donde se obtuviera la diferencia en porcentaje de viabilidad, para el control negativo (sin exposición a la luz UV) y las células expuestas a luz UV. Para determinar en qué tiempo se observaba mayor diferencia significativa entre la viabilidad del control y la viabilidad de las células expuestas a la luz UV, se tomó como tiempo 20 minutos, el tiempo de exposición al sol recomendado por la OMS es de 16 minutos en promedio, lo cual nos da un indicio del tiempo que se debe considerar para la prueba, además se obtuvo mayor porcentaje de viabilidad con respecto al control, en comparación con los otros tiempos de exposición.

Con respecto a la repetibilidad, las desviaciones estándar que se obtuvieron fueron valores pequeños, lo que indicó que los datos son cercanos a la media.

El coeficiente de variación para fototoxicidad no fue mayor al 25%, que es el porcentaje permitido para ensayos de fototoxicidad⁴⁷, por lo que cumple con el criterio de aceptación. Y con respecto a reproducibilidad para citotoxicidad sus porcentajes de viabilidad de células es similar, y sus dispersiones son muy bajas.

Para la linealidad del método se obtuvieron coeficientes de variación que demuestran una relación entre las concentraciones y el aumento de la viabilidad.

De acuerdo a las pruebas de solubilidad con DMSO y acetona, se observó que el compuesto era soluble en dichos solventes, en cuanto a la formulación, el compuesto FLS-3 es soluble en fase oleosa.

El pH es importante para los cosméticos ya que si este no es el adecuado puede afectar su calidad como la estabilidad, ocasionando irritabilidad en la piel, precipitación de excipientes e incluso favorecer una contaminación microbiana. El pH de la piel es de 5 a 5.5 en una piel sana, por lo que es recomendable utilizar productos que tengan un intervalo de pH (pH 5.5 a pH neutro) de acuerdo a la literatura, el pH que se obtuvo se mantuvo dentro de los límites aceptables⁴.

En el barrido de luz UV se puede observar que el compuesto FLS-3 absorbe en el rango de luz UV-B, que corresponde de 320 a 400 nm, por lo que se le pueden atribuir propiedades fotoprotectoras. La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta hasta la visible del espectro, en este caso se utilizó el rango de la luz UV de 190 a 500 nm.

Tanto en el barrido de luz UV de acetona, como en el de DMSO se observó que absorbe en el rango de UVB (320-400 nm), dicho rango de absorción indica que el compuesto puede tener propiedades fotoprotectoras, ya que la mayoría de los filtros solares absorben en el espectro UVB (290-320 nm) por ejemplo: octilsalicilato, octilmetoxicinamato, o en ambos espectros UVA y UVB (200-350 nm) por ejemplo: benzofenona-3³³.

Dentro de los ensayos de citotoxicidad para el compuesto de prueba se observa que no hay diferencia significativa con respecto al control, por lo que se puede decir que el compuesto no es citotóxico.

Se realizó una formulación, a la cual no se le añadió conservador, sólo se realizó para saber si era soluble en fase oleosa, sin embargo, a partir de dicha formulación se puede realizar otra, añadiendo un conservador o realizando las pruebas que dicta la NOM 089 para determinar los límites microbianos, para asegurar que aún sin conservador, el filtro solar es inocuo.

Para la formulación se midieron diferentes parámetros el pH obtenido fue de 7, entra dentro de los parámetros establecidos. La viscosidad se define como la resistencia al flujo, ésta fue de 8010 cP en el filtro control y 6020 cP en el filtro de prueba, dichos valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

En la prueba de citotoxicidad del filtro de prueba se puede observar que no hay diferencias significativas con respecto al control, por lo que se puede decir que el compuesto no es citotóxico.

En la prueba de Fototoxicidad del filtro de prueba se pudo observar que no hay diferencias significativas a diferentes concentraciones, dichas concentraciones tienen propiedades fotoprotectoras, por lo que se le puede atribuir efecto fotoprotector, comparando con la gráfica del compuesto FLS-3 en la que no hubo diferencias significativas, se puede atribuir un efecto sinérgico una vez en fase oleosa. La acción fotoprotectora de los filtros se debe a su capacidad de absorber los rayos UV, impidiendo la transmisión de la radiación hacia los tejidos subyacentes y evitando así cualquier efecto nocivo³⁰.

El efecto fotoprotector del filtro con el compuesto FLS-3, puede deberse a que la molécula tiene dobles enlaces, los cuales funcionan como grupos cromóforos, dichos grupos son los grupos funcionales responsables de la absorción, principalmente son dobles y triples enlaces carbono-carbono, sistemas aromáticos, grupo carbonilo, imino (C=N), diazo (N=N) nitro y enlaces C-Y (Y es un átomo con pares libres)³¹. Cuando los grupos cromóforos absorben la energía del fotón, se mueve a una energía más alta (excitado) y llega a ser inestable. Esto puede resultar en un cambio estructural, otras moléculas que definen un efecto directo o actuando como sensibilizante generando especies reactivas de oxígeno que dañan moléculas adyacentes como DNA o proteínas (efecto indirecto). En el estado excitado, los cromóforos son los iniciadores de toda la respuesta fotobiológica.

El filtro comercial no protege a las células contra la radiación UV, ya que el filtro comercial utilizado contiene octocrileno, benzofenona-3, butilmetoxidibenzoilmetano, etilhexilbenzoato, los cuales son filtros químicos que están compuestos por moléculas orgánicas con grupos cromóforos en la región UV, ya que poseen electrones poco ligados. En éste caso se observó pérdida de la viabilidad, esto puede deberse a que los fotones de la luz UV interactúan con el oxígeno atómico para promover la formación de radicales libres, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical de la reactividad más alta, el hidroxilo. Los radicales libres atacan moléculas, tales como, proteínas, lípidos, ADN, ARN, alterando su estructura e interfiriendo con su función³².

El producto no fue irritante, de acuerdo a los requerimientos del MGA 0515 de la FEUM 15^a, por lo que es seguro para aplicar a la piel.

En cuanto al método éste puede mejorar, utilizando un simulador solar con las longitudes de onda específicas. Lo que se realizó en la tesis fue un método primario, ya que no se contaba con el simulador solar, se probaron diferentes parámetros para poder validar el método, desde la distancia hacia la lámpara UV, hasta las concentraciones, y definir qué tiempo era en el que disminuía la viabilidad de las células.

Las pruebas realizadas pueden complementarse con pruebas de seguridad, tales como la prueba de hipersensibilidad retardada, así como pruebas microbiológicas.

9. Conclusiones

Se planteó un método alternativo al uso de animales para probar determinar la Fototoxicidad del compuesto FLS-3.

Se validó el método de Citotoxicidad y el método de Fototoxicidad, cumpliendo con los criterios de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad.

En los espectros de radiación UV, se observó que el compuesto absorbió en la longitud de onda que corresponde a los espectros de radiación UVA y UVB.

El compuesto FLS-3 no fue citotóxico, por lo que es seguro a las dosis utilizadas.

La inclusión del compuesto FLS-3 en una formulación, incrementó la viabilidad de las células, por lo que podemos decir que hay un efecto sinérgico del compuesto para proteger a las células, comparándolo con la base.

La formulación con el compuesto FLS-3 al 1%, fue estable después del ciclado térmico y no causó irritación en piel de conejo Nueva Zelanda.

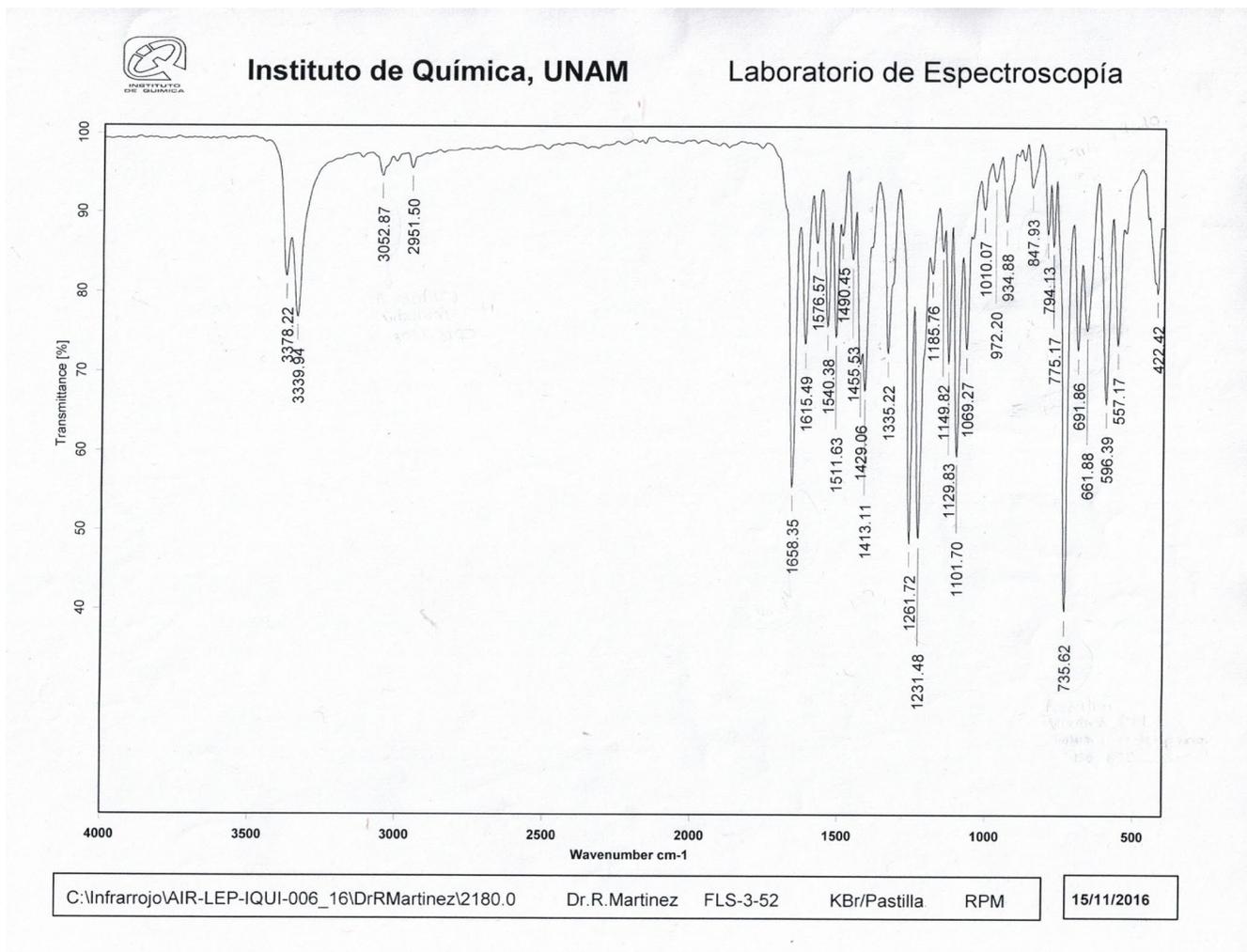
10. Anexos

Anexo I. Compuestos de prueba

Se realizó una solución stock de 1000 μ g/mL para ello se pesaron 5 mg de producto, se adicionó 1 mL de DMSO se colocó a baño maría para disolver, y se le agregaron 4 mL de medio DMEM. Posteriormente se realizaron las diluciones para obtener las concentraciones de prueba.

Se tomaron 500 μ L de la solución stock y se le añadieron 500 μ L de medio, para obtener una solución de una concentración de 500 μ g/mL, de ésta se tomó una alícuota de 800 μ L, se adicionaron 200 μ L de medio, para obtener la concentración de 400 μ g/mL. De ésta última se tomó una alícuota de 625 μ L y se le añadieron 375 μ L de medio para la concentración de 250 μ g/mL. De ésta última se succionó una alícuota de 500 μ L y se le añadieron 500 μ L de medio para la concentración de 125 μ g/mL. De ésta última se extrajo una alícuota de 500 μ L y se le añadieron 500 μ L de medio para la concentración de 62.5 μ g/mL. De ésta última se tomó una alícuota de 480 μ L y se le añadieron 520 μ L de medio para la concentración de 30 μ g/mL. De ésta última se succionó una alícuota de 500 μ L y se le añadieron 500 μ L de medio para la concentración de 15 μ g/mL. De ésta última se extrajo una alícuota de 500 μ L y se le añadieron 500 μ L de medio para la concentración de 7.5 μ g/mL. De ésta última se tomó una alícuota de 400 μ L y se le añadieron 600 μ L de medio para la concentración de 3 μ g/mL. De ésta última se succionó una alícuota de 500 μ L y se le añadieron 500 μ L de medio para la concentración de 1.5 μ g/mL.

Anexo II



Anexo III Solubilidad (FEUM 10ª Edición)

Siempre que se menciona solubilidad debe entenderse que es el grado de disolución de un polvo dentro de 30 minutos en un disolvente a la temperatura de 25°C con agitación vigorosa durante 30 s a intervalos de 5 minutos, esta propiedad se expresa con los siguientes términos:

Términos	Partes de disolvente en volumen requeridas para una parte de soluto
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 11 a 30 partes
Ligeramente soluble	De 31 a 100 partes
Poco soluble	De 101 a 1000 partes
Muy poco soluble	De 1001 a 10000 partes
Casi insoluble	Más de 10000 partes

11. Referencias

1. Wolff, K. *et. al.* Dermatología en Medicina General 7ª edición, Medica Panamericana, Buenos Aires, 2009 pp. 57
2. Dumont, C. *et. al.* Review of the Availability of *In Vitro* and *In Silico* Methods for Assessing Dermal Bioavailability applied *In vitro* Toxicology Volume 1, Number 2, 2015.
3. Navarrete G., Curso de Posgrado de Dermatopatología. UNAM.Histología de la piel, recuperado en 12 de agosto de 2018 de <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no46-4/RFM46403.pdf>
4. Avila, T. Caracterización de un filtro solar a base de extracto de fresa (*fragaria vesca*) y mandarina (*citrus reticulata*), Ciudad de México, 2017 (Tesis) pp. 53
5. Revista peruana de Dermatología, Fisiología de la piel, Vol 11 N° 2, 2001, consultado en http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v11_n2/fisio_piel.htm
6. Comprendiendo la piel, Factores que influyen sobre la piel <https://www.eucerin.com.mx/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/factores-que-influyen-sobre-la-piel>
7. Recomendaciones EURL-ECVAM recuperado el 20 de agosto de 2018 en <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
8. González, M. *et. al.* La radiación ultravioleta. su efecto dañino y consecuencias para la salud humana, Theoria, Vol. 18, Cuba, 2009, pp.70.
9. Sistema de monitoreo atmosférico recuperado en 20 de agosto de 2018 de <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27ZaBhtml=&dc=%27aA>
10. González M. *et. al.* *Daño Oxidativo y Antioxidantes*, Bioquímica, vol. 25, Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C. Distrito Federal, México, marzo 2000.
11. González, L. Los efectos nocivos de la radiación solar y la forma de combatirlos, Offarm Vol.22, 5 mayo 2003.
12. Young, A. *et. al.*, La piel y la radiación ultravioleta: Fotobiología y fotoprotección de los filtros solares Instituto de Dermatología Londres, Volumen 76 Núm. 3, 2016 pp.101.

13. Battle, C. Factor de Protección Solar, OFFARM, Vol. 24 Núm. 6 junio 2005 pp. 70.
14. Azcona B. L., Protección solar actualización, Farmacia Profesional Vol. 17 Núm. 5, mayo 2003.
15. Unión Europea, Laboratorio de alternativas para la experimentación con animales recuperado en 03 de enero de 2018 en <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
16. Marín D. Filtros solares. Características, tipos y requerimientos, OFFARM Vol. 24 Núm. 9 octubre 2005
17. CANIPEC, en 25 de septiembre de 2016 Protección solar y bronceadores, consultado en línea <http://canipec.org.mx/consumoinformado/producto/proteccion-solar-y-bronceadores/>
18. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11698/38380>, consultado en web 29 de noviembre de 2016 12:13 p.m.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-141-SSA1/SCFI-2012, Etiquetado para productos cosméticos preenvasados. Etiquetado sanitario y comercial disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5269348&fecha=19/09/2012 (consultado el 30 Noviembre 2016 12:37 p. m.)
20. COFEPRIS, Marco jurídico que regula la producción y comercialización de cosméticos, productos de belleza, aseo y servicios en México, disponible en: http://www.cofepris.gob.mx/Biblioteca%20Virtual/docint2_archivos_/aR2.pdf (consultado el 15 de Diciembre de 2016 a las 11:40 a.m.)
21. Norma Oficial Mexicana NOM-118-SSA1-1994, Bienes y servicios. Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes y pigmentos inorgánicos. Especificaciones sanitarias. Consultado en línea en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/118ssa14.html>
22. Martín S. Preparación para el bronceado, Farmacia Profesional Vol. 19, Núm. 4, abril 2005 pp. 69
23. Mukul, S. *et al*, Cosmeceuticals for the skin: an overview, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, Vol. 4, Núm. 2, 2011, pág. 3

24. Macías, M. *Situación actual sobre protectores solares en Latinoamérica*, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 2014 (Tesis)
25. Cárdenas N. y Pedraza J. *Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos* Educación Química, agosto 2005, pp 167.
26. Vescovi J., et. al. *Evaluación de fotoestabilidad de cinco filtros UV, trans resveratrol y beta-carotenos en filtros solares*. European Journal of Pharmaceutical Science, Brasil, 2015, pp. 80
27. Sendra M., et. al. *Effects of TiO₂ nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment*, Environment International, 2015, pp.62
28. MS Latha M.D, *Sunscreen agents*, Clinical a esthetic Dermatology, Vol.6, Número 1, enero 2013, pp. 16-17.
29. Dijoux, N. et. al. *Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay*, Toxicology In vitro, Volumen 20 Número 4, Junio 2006, pp. 1 disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691508000124> (consultado el 06 de junio de 2017 a las 10:51 p.m)
30. López, R. *Guía para el uso y elección de protectores solares y componentes para la industria cosmética y consumidores finales*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México D.F., 2012, pp. 65 (Tesis).
31. Fernández, G. Espectroscopia visible-ultravioleta, disponible en <http://www.quimicaorganica.org/espectroscopia-visible-ultravioleta/735-grupos-cromoforos-y-auxocromos.html> (consultado el 07 de junio de 2017, a las 12:26 p.m.)
32. D'orazio J. et.al. *Radiación UV y piel*, International Journal of Molecular Science, junio 2013, pp. 9 disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709783/pdf/ijms-14-12222.pdf> (Consultado el 07 de junio de 2017, 13:07 p.m.)
33. Hayden C., *Sunscreen Penetration of Human Skin and Related Keratinocyte Toxicity after Topical Application*, Skin pharmacology and physiology, Mayo 2005, pp 173-174.

34. George J. Todaro and Howard Green, M.D. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York.
35. Vinardell M. Alternativas a la Experimentación Animal en Toxicología: situación actual, Acta bioética, 2007.
36. Meneau R. I. Métodos Alternativos en Toxicología, Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 45, Núm. 1, Cuba, 2013, pp. 19.
37. Lim, H. W. y Draelos, Z. D., Guía Clínica para Filtros solares y fotoprotección, Informa Healthcare, Estados Unidos, 2009, pp. 44.
38. Sun, S. Producción de melanina comestibles por *Auricularia auricular* y sus propiedades fisicoquímicas, Food Chemistry, China, 2016, pp. 486.
39. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 10ª Edición, Tomo I, pp. 15.
40. De Silva, *Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules*. Pharmaceutical Research, 2003.
41. ISO 11930 Cosméticos - Microbiología - Evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético.
42. NOM 073 Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996). Consultado 15 de agosto de 2018.
43. Dórazio J. *et. al*, La piel y la radiación UV, International Journal of Molecular Science, junio 2013, pp. 12225.
44. ISO 22716 Buenas Prácticas de Manufactura.
45. ISO 11930:2012 Cosméticos - Microbiología - Evaluación de la protección antimicrobiana de un producto cosmético.
46. ISO 24443: 2012 Determinación de fotoprotección *In vitro* de filtros solares UVA.

47. *Invitox* N° 44, Protocolo Prueba de Fototoxicidad en cultivo celular del Laboratorio Europeo de Alternativas para la Experimentación con animales
48. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos (modifica a la NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos, publicada el 3 de agosto de 1996.
49. Cosmetics ingredient review, recuperado en 20 de agosto de 2018, de <https://www.cir-safety.org/ingredients>
50. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos.
51. Guía ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology).
52. Taype E. "Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular in vitro de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética" Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica E.A.P. de Farmacia y Bioquímica TESIS.
53. Morison, W.L.; Sunscreen: Safe and effective? Recuperado en 09 de septiembre de 2018 en <https://www.skincancer.org/prevention/sun-protection/sunscreen/sunscreens-safe-and-effective>.
54. Merck index online recuperado en <https://www.rsc.org/Merck-Index/> en 20 de agosto de 2018.
55. Estructura de la procianidina B1, recuperada en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11250133#section=Top> el 20 de agosto de 2018.
56. PROY-NOM-259-SSA1-2014. Buenas prácticas de fabricación en productos cosméticos.