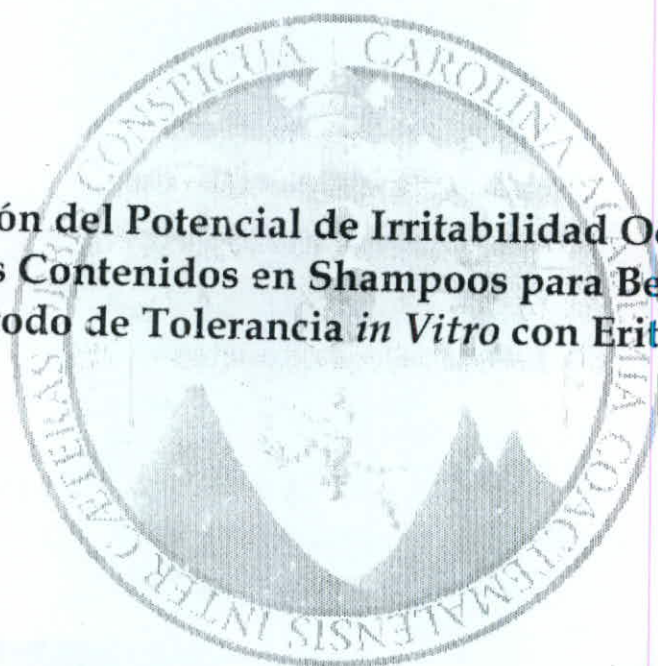


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**"Determinación del Potencial de Irritabilidad Ocular Causado por
Surfactantes Contenidos en Shampoos para Bebé Aplicando el
Método de Tolerancia *in Vitro* con Eritrocitos"**



Vivian Rosmeri Sicán López

Química Farmacéutica

Guatemala, septiembre de 2006

DL
06
T(2353)

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.

DECANO

Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona, M.A.

SECRETARIA

Licda. Lillian Raquel Irving Antillón

VOCAL I

Licda. Liliana Vides de Urizar

VOCAL II

Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez

VOCAL III

Br. Angel Damián Reyes Valenzuela

VOCAL IV

Br. Angel Jacobo Conde Pereira

VOCAL V

DEDICATORIA

A Dios

Por darme sabiduría, humildad, persistencia capacidad y una familia que me apoya para lograr mis objetivos.

A mis padres

Por ser los pilares en quienes me apoyé para llegar hasta este momento. Eternamente gracias por la vida, gracias por lo que soy y por lo que tengo... Los amo...

A mis hermanas

Por ser parte de éste y muchos más objetivos en mi vida, especialmente a Lilian, por confiar en mí. Que Dios las bendiga.

A mi novio Erick A.

Por darme la oportunidad de conocerte, por estar con migo en lo bueno y en lo malo, por apoyarme en los momentos de necesidad.

AGRADECIMIENTOS

Licda. Geraldina de Samayoa

Por se la promotora de esta investigación.

Licda. Sara Jáuregui

Por toda la asesoría y valiosas sugerencias que me brindó para la realización de éste trabajo de tesis.

Ing. Ana Lili de Ramos

Ing. Josué Sáucedo

Ing. José Rivas

Por la colaboración incondicional que me proporcionaron, ya que sin su ayuda hubiera sido más difícil la culminación de ésta investigación.

A mis compañeros de promoción

Por compartir buenas y malas experiencias.

A todas las personas que me ayudaron de una u otra forma durante la realización de ésta investigación.. Muchas gracias..

A usted, por estar presente.

INDICE

RESUMEN _____	3
INTRODUCCION _____	4
ANTECEDENTES _____	6
JUSTIFICACION _____	9
OBJETIVOS _____	10
HIPÓTESIS _____	11
MATERIALES Y METODOS _____	12
RESULTADOS _____	18
DISCUSION DE RESULTADOS _____	27
CONCLUSIONES _____	29
RECOMENDACIONES _____	30
REFERENCIAS _____	31
ANEXOS _____	34

1. RESUMEN

Se determinó el potencial de irritabilidad ocular de cuatro marcas de champú para bebé aplicando el método de Tolerancia in Vitro con eritrocitos. Las marcas que se utilizaron fueron dos de manufactura internacional y dos de manufactura nacional, ambas de amplio consumo en la población guatemalteca.

Se utilizó para el análisis sangre de procedencia humana, de la cual se extrajeron eritrocitos en solución, los cuales fueron puestos en contacto con diferentes diluciones de las muestras de champú, mezclas que posteriormente fueron leídas por espectrofotometría para calcular el HB50 (concentración que lisa el 50% de los eritrocitos) y el ID (índice de desnaturalización que indica el grado de desnaturalización de proteínas). Estos datos fueron correlacionados con el biomodelo del test de draize para clasificar cada marca dentro de un perfil de irritabilidad ocular que puede ser: desde altamente irritante hasta no irritante, según el valor que se obtiene del cociente entre el HB50 y el ID.

Se concluye mediante este método, que las dos marcas nacionales y una internacional resultaron ser irritantes, solo la marca internacional resultó ser moderadamente irritante. Todas las marcas evaluadas declaran en su empaque ser no irritantes al ojo del bebé, sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran lo contrario, por lo que no cumplen con esta especificación.

2. INTRODUCCION

En Guatemala, la ausencia de normativas establecidas por COGUANOR y de métodos adecuados para evaluar parámetros de calidad en productos cosméticos, conlleva a algunas de las empresas involucradas en este sector, a no tomar en cuenta el parámetro de tolerancia ocular para la elaboración y análisis de estos cosméticos, especialmente los champú para bebé que constituyen un importante grupo dentro del sector cosmético (8).

La tendencia mundial de los países especializados en este tema está encaminada a la evaluación de este parámetro en los champú para niños, utilizando métodos alternativos a los ensayos realizados con biomodelos (que utilizan animales de laboratorio). La Unión Europea ha hecho énfasis en el desarrollo e implementación de nuevas técnicas para evaluar la eficacia y la seguridad de los productos cosméticos, y dentro de su legislación se encuentra una normativa (86/609) del Comité de Ética Europeo (EEC), la cual enfatiza en lo siguiente: "Solo se emplearán animales en ensayos de laboratorio siempre y cuando se demuestre que los resultados experimentales no pueden obtenerse por otros procedimientos o alternativas" (13).

En esta investigación se realizó la prueba de tolerancia ocular *in Vitro*, a través de un procedimiento confiable, sencillo y económico que permite ponderar el riesgo de un tensoactivo o mezcla de ellos contenidos en champú para bebé. La prueba de tolerancia ocular tradicionalmente se realiza *in vivo*, colocando las sustancias activas directamente en el ojo derecho del conejo (test de Draize). En esta investigación se realizó la misma prueba pero *in vitro*, poniendo en contacto muestras de diferentes tipos de champú con una muestra tratada de eritrocitos humanos, simulando así las propiedades fisiológicas e isotónicas del glóbulo ocular.

La actividad irritante de las muestras analizadas fue medida mediante la cuantificación espectrofotométrica UV-VIS de oxihemoglobina, liberada como resultado de procesos hemolíticos y de desnaturalización, producidos por el tensoactivo. Estos procesos son semejantes a los que ocurren cuando un tensoactivo es irritante al globo ocular, es por ello que se utilizan glóbulos rojos en lugar del ojo del conejo.

Los datos obtenidos se correlacionaron con la escala establecida por el test de Draize, clasificando así a cada muestra dentro de un perfil de irritabilidad ocular que puede ser, según la escala establecida por el método de Draize: no irritante, ligeramente irritante, moderadamente irritante y muy irritante (14).

El análisis se realizó con una muestra suficiente de sangre humana y 10 muestras de diferentes lotes de dos marcas de champú de la industria nacional y dos importadas, ambas comercializadas en Guatemala, para hacer un total de 40 muestras. El muestreo de los champú se realizó en cinco centros comerciales de diferentes puntos de la ciudad capital.

La importancia de este estudio radica en la necesidad de proporcionar, implementar y/o sugerir una técnica sencilla y práctica para la evaluación del parámetro irritabilidad ocular (que es necesaria principalmente en productos de higiene para bebé según la FDA) (24), y a la vez evaluar la calidad y seguridad de estos productos, ya que actualmente algunos usuarios han reportado signos de irritación ocular en los niños; a lo cual se le debe prestar atención, pues según estudios de la FDA y CTFA el efecto irritante de los tensoactivos a largo plazo produce daños como eritema, edema, necrosis y opacidad de la córnea (11). El riesgo es mayor en los champú para niños ya que el tejido ocular del bebé es más sensible y está más expuesto al contacto del producto, el cual generalmente es utilizado a diario.

3 - ANTECEDENTES

En Guatemala no existe un método estandarizado, ni una norma establecida para realizar el control de calidad del parámetro irritabilidad ocular en cosméticos para niños. Sin embargo, existen algunos estudios relacionados con el tema, los cuales se describen a continuación:

3.1 EVALUACION DE LOS CHAMPU QUE SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA. Tesis graduación Vilma Susana oliva de Vargas. 1965.

En esta investigación, el autor hace una evaluación de diversas características fisicoquímicas: producción de espuma y su estabilidad, acción detergente y limpiadora, acción humectante, acción irritante (utilizando cuyos en lugar de conejos), pH, viscosidad, ácidos grasos, cenizas. Esto lo hizo en 34 muestras de champú que se comercializaban en Guatemala. Llegó a establecer que no todos los champús, tanto de origen nacional como internacional, cumplen con los requisitos de calidad estándares (11).

3.2 EVALUACION DE ALGUNAS CARACTERISTICAS DE CALIDAD DE SOLUCIONES OFTALMICAS MANUFACTURADAS POR LA INDUSTRIA FARMACEUTICA NACIONAL. Tesis graduación: Ileana Patricia Aguirre medina. 1991.

En este trabajo de investigación, el autor(a) evalúa ph, esterilidad e isotonía en soluciones oftálmicas manufacturadas por 6 laboratorios nacionales que se dedican a la elaboración de este tipo de productos. Utilizó las normas establecidas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXI). Llegó a determinar que el 21% de las muestras no cumplen con los requisitos de esterilidad, el 100% cumplen con pH y ninguna cumple con el requisito de isotonía. Lo anterior pone de manifiesto que no todos los laboratorios cumplen con los requisitos necesarios para elaboración de productos isotónicos (colirios y productos cosméticos) (1).

3.3 EVALUACION DE LA CALIDAD FISOCOQUIMICA DE LOS CHAMPU PARA CABELLO NORMAL QUE SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA. Tesis graduación: Amalia Elizabeth Molina Salá i. 1999.

En este trabajo de tesis, el (a) autor (a) evalúa la calidad fisicoquímica de los champú para cabello normal comercializados en Guatemala, determinando al mismo tiempo el valor de la viscosidad, claridad, apariencia, contenido neto, pH y contenido de materia activa de los mismos. Utilizó 7 marcas comerciales. Empleó la norma colombiana 1689. Llegó a determinar que el 95% de las muestras analizadas cumplen con los requisitos establecidos por dicha norma, y el 5% restante no cumplen en cuanto al contenido neto (lo cual no afecta significativamente la calidad del producto) (9)

3.4 PRUEBA DE TOLERANCIA IN VITRO PARA PREPARACIONES CON SURFACTANTE EN SU FORMULACION. Artículo científico: J.J. Vallejo. Universidad de Antioquia, Colombia. 2004. Revista de la facultad de Química Farmacéutica.

En esta investigación, el autor emplea un procedimiento confiable, sencillo y económico que permite ponderar el riesgo de un tensoactivo o mezcla de ellos cuando son puestos, bajo condiciones controladas, en contacto con una población de eritrocitos *in vitro*, evidenciando en estos procesos de hemólisis y desnaturalización de proteínas. Utilizó una mezcla de varios tensoactivos y los evaluó ante las muestras de eritrocitos (13).

3.5 INCORPORACION DE DOS METODOS ALTERNATIVOS PARA EVALUAR IRRITACION OCULAR, REALIZADO EN UN LABORATORIO DE TOXICOLOGIA. Murillo George Gisella, Luis Ulpiano Pérez y Enyieyis Tur Naranjo. Centro de Toxicología y Biomedicina.

Instituto Superior de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba. Revista Cubana de Farmacia. 2004. 38(3).

Evaluaron 2 ensayos alternativos al uso de animales de laboratorio que han sido propuestos para determinar el potencial de irritación ocular de sustancias químicas y formulaciones: uno que utiliza eritrocitos bovinos (Método RBC) y otro, la membrana corioalantoidea del embrión de pollo de 10 días de incubación. Hallaron el potencial de irritación de algunas

sustancias tales como lauril sulfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de benzalconio y polietilenglicol. Encontraron que la clasificación para cada una de las sustancias fue igual a la referida en un protocolo ya establecido. Fueron irritantes el cloruro de benzalconio, el lauril sulfato de sodio y el hidróxido de sodio; no resultó irritante el polietilenglicol. Este comportamiento es el mismo que se ha obtenido en estudios *in vivo*. Además de ofrecer resultados confiables, estas técnicas resultaron ser económicas, rápidas y de fácil realización, en comparación con el procedimiento tradicional que se realiza en conejos (10).

4 - JUSTIFICACION

Actualmente en Guatemala la industria cosmética está en crecimiento constante, y los champú para niños, constituyen un alto porcentaje del total de cosméticos que se utilizan. Este tipo de productos, además de que deben fabricarse con materias primas calificadas, deben cumplir con parámetros básicos de calidad. En los productos para bebé, específicamente los champú, debe tomarse en cuenta que el producto constantemente entra en contacto directo con el tejido ocular y la piel de bebé, los cuales son tejidos que se caracterizan por ser poco desarrollados, sensibles y muy delicados. Debido a lo anterior, es primordial y fundamental que el champú limpie el cabello sin dañar estos tejidos, debe ser inocuo y no irritante al ojo (5), (8). Este es un requerimiento de calidad que deben cumplir los champú para bebé según la FDA (24).

Por la importancia del cuidado del tejido ocular en los niños, se hace necesario realizar esta investigación, dando una alternativa accesible para verificación de la "No Irritabilidad Ocular" en estos cosméticos de amplio consumo en la población guatemalteca, sin utilizar animales para esta prueba.

En Guatemala no se dispone de una normativa, ni de un método establecido para evaluar tolerancia ocular en champu, y en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social no se realiza este ensayo, es por ello, que la presente investigación es de importancia nacional, ya que con los convenios comerciales ratificados por el gobierno de Guatemala con otros países, tales como el Tratado de Libre Comercio y el Mercomún Centroamericano, los productos cosméticos fabricados en Guatemala deberán cumplir con estándares de calidad internacionales (uno de los estándares para champú de niños es ser no irritantes del glóbulo ocular), para competir en el mercado nacional e internacional.

5 - OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad y seguridad de los champú para bebé, que se comercializan en los supermercados de la ciudad capital.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 5.2.1 Determinar el grado de irritabilidad ocular en champú para bebé, de marcas líderes Comercializadas en Guatemala (producto nacional e importado)
- 5.2.2 Confirmar que los champú para bebé calificados como “No irritantes”, realmente son calificados como tal.
- 5.2.3 Establecer un método sencillo, práctico y ecologista que sirva de apoyo a las entidades encargadas de evaluar este parámetro de calidad (irritabilidad ocular), importante en los productos cosméticos que contengan surfactantes.

6. HIPOTESIS

Los champú para bebé comercializados en la ciudad de Guatemala, calificados como “no irritantes para los ojos de los niños”, se encuentran dentro de un rango de irritabilidad ocular en el que pueden ser irritantes o moderadamente irritantes, al ser sometidos a la prueba de irritabilidad ocular aplicando el método de Tolerancia in Vitro con eritrocitos.

7 - MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO Y MUESTRA

7.1.1 UNIVERSO

El universo lo conformaron los productos de higiene personal que se encuentran en el mercado: champú para bebé.

7.1.2 MUESTRA

La investigación se realizó con dos marcas populares de champú para bebé:

Dos de manufactura nacional [Marca A y Marca B] (constituyen un 40% del consumo total) y dos marcas importadas [Marca C y Marca D] (constituyen un 60% del consumo) (17). Estos productos, según el fabricante, son de categoría no irritante para los ojos del bebé.

7.2 MATERIALES

7.2.1 EQUIPO Y CRISTALERIA

- Bolsa para recolección de sangre (con anticoagulante PDA)
- Jeringas
- Liga
- Tubos de ensayo
- Tubos para centrífuga
- Pipetas (0.1, 1.00 mL)
- Pizeta
- Regilla para tubos
- Beckers de 1 L.
- Magnetos para agitación

7.2.2 REACTIVOS

- Buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS)
- Sal Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
- Cloruro de Sodio
- Hidróxido de sodio 0.5 N
- Muestras de champú
- Sangre humana fresca

7.2.3 INSTRUMENTOS

- Espectrofotómetro UV-Visible
- Centrifuga
- Balanza analítica
- Agitador para soluciones
- Refrigeradora

7.2.4 MATERIALES DE ESCRITORIO

- Hojas bond
- Lapiceros
- Computadora
- Calculadora científica
- Cronómetro

7.3 METODOLOGIA

FASE I

- Obtención de muestra de sangre

La sangre que se utilizó fue de procedencia humana (no importando el tipo de sangre)

Teniendo ya listo el material para la venopunción, se procedió a canalizar la vena del donante, sujetando bien el catéter, el cual se dejó durante el tiempo necesario para

recolectar aproximadamente 0.3 L de sangre. La muestra recolectada se refrigeró durante el tiempo que se utilizó, a una temperatura de 4-10°C.

→ Separación y tratamiento de eritrocitos

En tubos para centrifuga se tomó un volumen de sangre y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Luego el sobrenadante y la capa oleosa se aspiraron con jeringa y se eliminó (el sobrenadante contiene residuos, plaquetas, leucocitos, etc.). El precipitado (eritrocitos), fue lavado 4 veces con buffer de fosfato (PBS), centrifugando en cada lavada a 1800 rpm durante 5-7 min. Posteriormente, el precipitado ya lavado fue resuspendido en buffer PBS, logrando obtener una solución de aproximadamente 10×10^6 glóbulos /mL. Esta concentración se preparó diluyendo las muestras de sangre en la mitad de su volumen inicial.

Esta muestra de eritrocitos preparada se refrigeró a una temperatura de 4-10°C, y se utilizó en un lapso no mayor a 8 horas para asegurarse de estar empleando eritrocitos en buen estado (no hemolizados).

→ Preparación de muestras para análisis

Se prepararon nueve diluciones de cada muestra de champú a evaluar, diluidas en buffer PBS, las cuales espectofotométricamente fueron desde 0% a 100% de hemólisis. Debe conocerse la concentración exacta de dichas diluciones, así como la composición química (nomenclatura INCI), número de carbonos, pH en solución y presencia de electrolitos del tensoactivo presente. Cada dilución se preparó agregando una cantidad de champú más una cantidad de buffer PBS salino, se aforaron a 10.00 ml y se agitaron durante 10 min. para lograr mezclar bien el champú con el buffer

FASE II

→ Análisis de muestras

Se realizaron dos procesos: Hemólisis (HB50) e Índice de desnaturalización (ID).

1) Proceso de hemólisis:

A cada dilución de las muestras para análisis ya preparadas, se le adicionó una cantidad constante e igual de solución madre de eritrocitos que está en buffer de fosfato salino. Estas muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación constante. Seguidamente cada dilución fue centrifugada a 1800 rpm., durante 5 min.

Inmediatamente después de la centrifugación se separó el sobrenadante de cada dilución, el cual fue leído a 540 y 560 nm contra una solución blanco *.

*la solución blanco contiene: PBS + solución madre de eritrocitos.

2) Proceso de desnaturalización

La muestra de cada dilución que resultó correspondiente al HB50, fue leída a 540 y 575 nm, para poder calcular el ID.

Previo a este proceso, se tomó la lectura de un blanco a 540 y uno a 575 nm.

7.4 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

7.4.1 NUMERO DE MUESTRAS Y DISEÑO DEL MUESTREO

El número de muestras fueron establecidas por conveniencia, es decir, las muestras que se evaluaron fueron de cuatro marcas líderes (dos nacionales y dos internacionales) y se muestrearon en cinco supermercados populares de la ciudad, en función del tiempo: se muestrearon aleatoriamente dos muestras de cada marca en dos supermercados diferentes, cada semana durante cinco semanas, lo cual hace un total de 40 muestras, 10 muestras de cada marca. Cada supermercado elegido fue muestreado en dos lugares distantes para abarcar el área de distribución total de los productos que se analizaron.

7.4.2 ANALISIS DE DATOS

El análisis de los datos obtenidos se presentaron de manera descriptiva; a través de tablas, medidas de tendencia central (media), gráficas, frecuencias y desviaciones estándares; de los cuales se obtuvo los valores de HB50 e ID, para luego correlacionarlos con la escala establecida por el test de Draize y posteriormente clasificar a cada marca dentro de un perfil que puede ir, desde no irritante hasta muy irritante.

7.4.2.1 OBTENCION DEL VALOR HB50

Con los resultados obtenidos en el espectrofotómetro, se trazó una curva que expresa la concentración de tensoactivo vrs. Absorbancia. Con estos datos, mediante derivación de la curva parabólica, se determinó el HB50 (concentración del tensoactivo que provoca lisis en el 50 % de los eritrocitos). La concentración hemolítica media de cada sustancia de prueba corresponde al punto de inflexión de la curva dosis-respuesta (el punto de inflexión es el valor máximo de la curva). El punto de inflexión se obtiene al derivar la ecuación cuadrática que resulta al graficar los puntos máximos de la curva.

7.4.2.2 OBTENCION DEL VALOR ID

El valor ID se obtuvo dividiendo la lectura de absorbancia a 575 nm., dentro de la obtenida a 540 nm, esto multiplicado por 100

$$ID = \frac{\text{(lectura de abs. A 575 nm)}}{\text{(Lectura de abs. A 540 nm)}} * 100$$

7.4.2.3 CALCULO DE RELACIÓN LISIS-DESNATURALIZACIÓN (L/D)

La relación L/D otorga el parámetro de comparación de los valores in vitro con los in vivo. La relación L/D es un valor, se obtiene así:

$$L/D = Hb50 / ID.$$

El valor L/D fue correlacionado frente a la escala de irritabilidad establecida por el test de Draize, para poder ubicar al producto en estudio, en un perfil de irritabilidad ocular que puede ser:

- no irritante
- ligeramente irritante
- moderadamente irritante
- irritante
- muy irritante

ESCALA PARA PONDERAR EL GRADO DE IRRITABILIDAD OCULAR DE SURFACTANTES, ESTABLECIDA POR EL TEST DE DRAIZE

PONDERACION	ENSAYO IN-VITRO RADIO L/D (Valor)
No irritante	> 100
Ligeramente Irritante	> 10
Moderadamente Irritante	> 1
Irritante	> 0.1
Muy irritante	< 0.1

8. RESULTADOS

8.1 ANALISIS DE DATOS MARCA "A"

PROCESO DE HEMÓLISIS

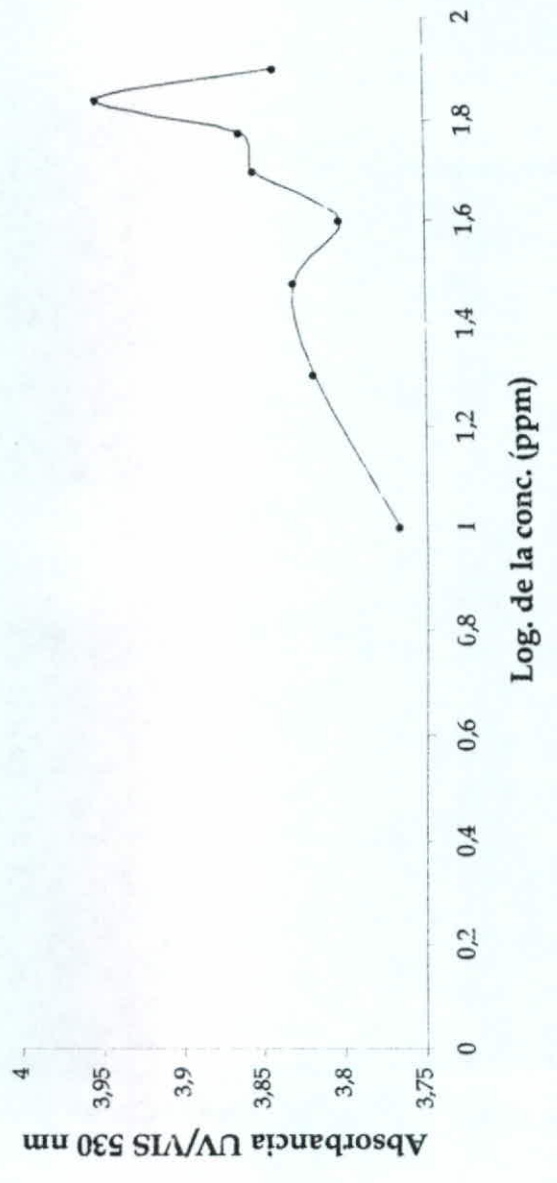
Conc. (ppm)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs 6	Abs 7	Abs 8	Abs 9	Abs 10	Promedio Absorb.	Desv- Estándar	Log. Conc. (valores X)	Log. Abs. (valores Y)
0	100	98	99	98	98	96	99	99	97	96	98	1.26	-----	1.9912261
10	5946	5946	5949	5945	5948	5948	5946	5948	5948	5946	5947	1.26	1.0000	3.7742979
20	6695	6696	6695	6695	6697	6698	6694	6695	6695	6699	6696	1.51	1.30103	3.8258154
30	6886	6891	6888	6888	6890	6891	6890	6891	6890	6886	6889	1.87	1.4771213	3.8381562
40	6442	6441	6445	6442	6445	6444	6443	6444	6442	6442	6443	1.34	1.60206	3.8090881
50	7260	7258	7258	7260	7261	7260	7259	7260	7258	7256	7259	1.41	1.69897	3.8608768
60	7394	7394	7396	7396	7397	7394	7397	7394	7396	7393	7395	1.37	1.7781513	3.8689382
70	9044	9045	9045	9047	9046	9047	9046	9045	9047	9047	9046	1.04	1.845098	3.9564566
80	7052	7052	7053	7055	7055	7055	7055	7056	7053	7055	7054	1.37	1.90309	3.8484355

HB50 = 68.76

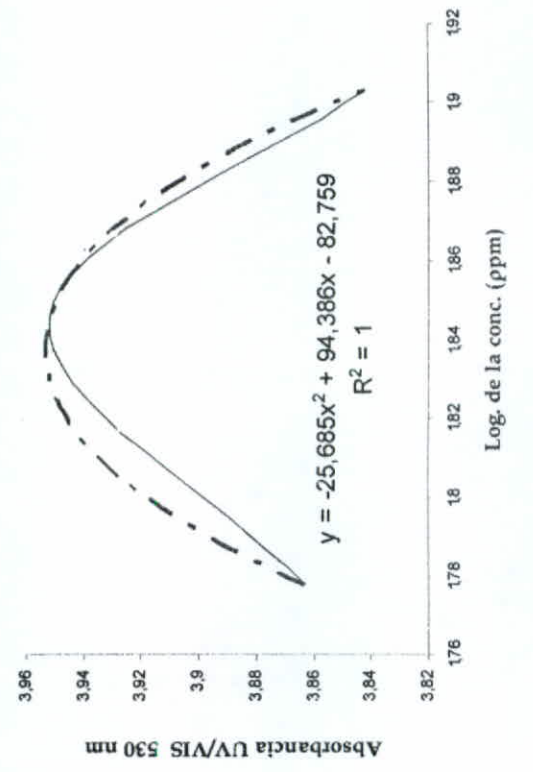
PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

Absorción 575 nm	Absorción 540 nm	Índice de Desnaturalización (%)
0.3726	0.3426	108.75

GRAFICA DE HEMOLISIS MARCA A



ANALISIS DE LA REGION PARA ENCONTRAR HB50 A



8.2 ANALISIS DE DATOS MARCA "B"

PROCESO DE HEMÓLISIS

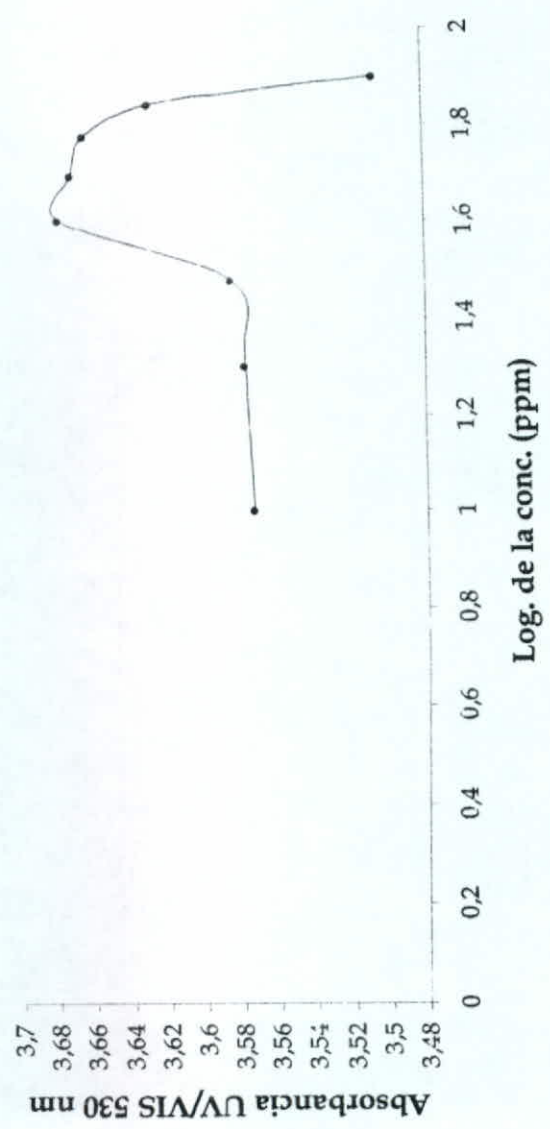
Conc. (ppm)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5	Abs. 6	Abs. 7	Abs. 8	Abs. 9	Abs. 10	Prom. Absorb.	Desv. Standar	Log conc. (valores X)	Log. Abs. (valores Y)
0	98	97	98	98	99	98	97	98	99	98	98	0.63	-----	1.994889
10	3748	3750	3749	3746	3750	3750	3751	3748	3748	3749	3749	1.37	1	3.573915
20	3783	3782	3784	3784	3784	3782	3781	3783	3782	3782	3783	1.00	1.30103	3.577836
30	3848	3846	3850	3847	3848	3847	3847	3847	3849	3850	3848	1.30	1.477121	3.585235
40	4770	4771	4768	4769	4770	4771	4770	4772	4771	4770	4770	1.07	1.60206	3.678518
50	4690	4690	4689	4688	4692	4690	4689	4690	4689	4689	4690	1.11	1.69897	3.671173
60	4604	4602	4606	4606	4604	4604	4605	4607	4608	4609	4605	1.93	1.778151	3.663324
70	4251	4248	4248	4250	4251	4251	4250	4250	4251	4253	4250	1.41	1.845098	3.628389
80	3209	3205	3206	3204	3208	3205	3208	3208	3205	3208	3207	1.68	1.90309	3.506099

HB50 = 46.65

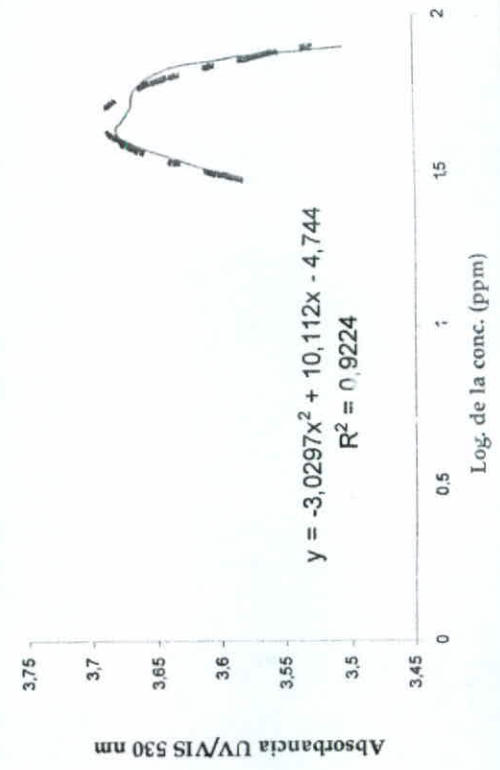
PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

Absorción 575 nm	Absorción 540 nm	Índice de Desnaturalización (%)
0.2750	0.8536	32.22

GRAFICA DE HEMOLISIS MARCA B



ANALISIS DE LA REGION PARA ENCONTRAR EL HB50 B



8.3 ANALISIS DE DATOS MARCA "C"

PROCESO HEMÓLISIS

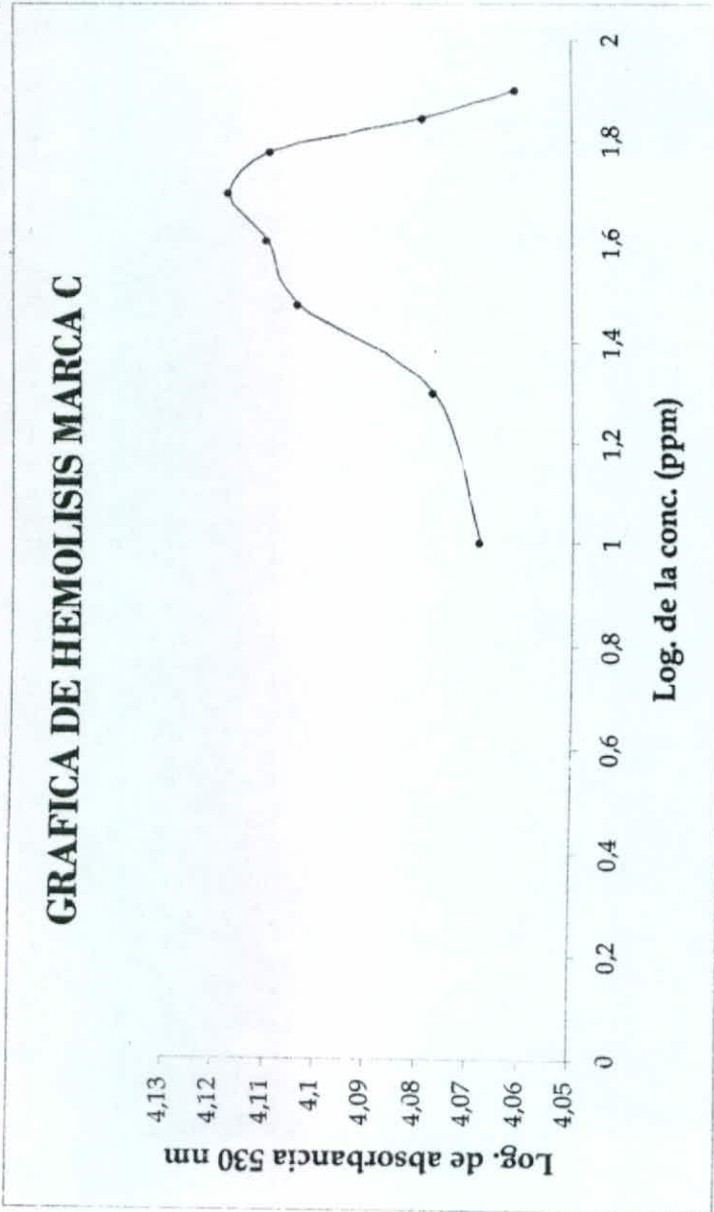
Cenc. (ppm)	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	Abs. 4	Abs. 5	Abs. 6	Abs. 7	Abs. 8	Abs. 9	Abs 10	Promedio Absorb.	Desviac. Standar	Log conc. (valores X)	Log Abs. (valores Y)
0	99.96	99.94	99.96	99.97	99.98	99.98	99.96	99.97	99	98	99.67	0.62	-----	1.999913
10	11703	11699	11699	11701	11702	11699	11701	11702	11701	11702	11701	1.27	1.00	4.068223
20	11952	11952	11954	11948	11950	11950	11950	11953	11953	11948	11951	2.00	1.30103	4.077404
30	12705	12705	12707	12705	12706	12708	12705	12707	12706	12706	12706	1.00	1.477121	4.104009
40	12877	12877	12879	12880	12880	12876	12881	12879	12879	12874	12878	2.03	1.60206	4.109848
50	13104	13102	13106	13106	13103	13106	13105	13104	13106	13107	13105	1.51	1.69897	4.117437
60	12854	12850	12853	12851	12853	12850	12853	12850	12853	12851	12852	1.46	1.778151	4.108971
70	11999	12003	12003	12001	12003	12000	12003	12004	12001	12000	12002	1.61	1.845098	4.079254
80	11508	11505	11506	11511	11508	11510	11512	11510	11508	11511	11509	2.16	1.90309	4.061038

HB50 = 48.72 ppm

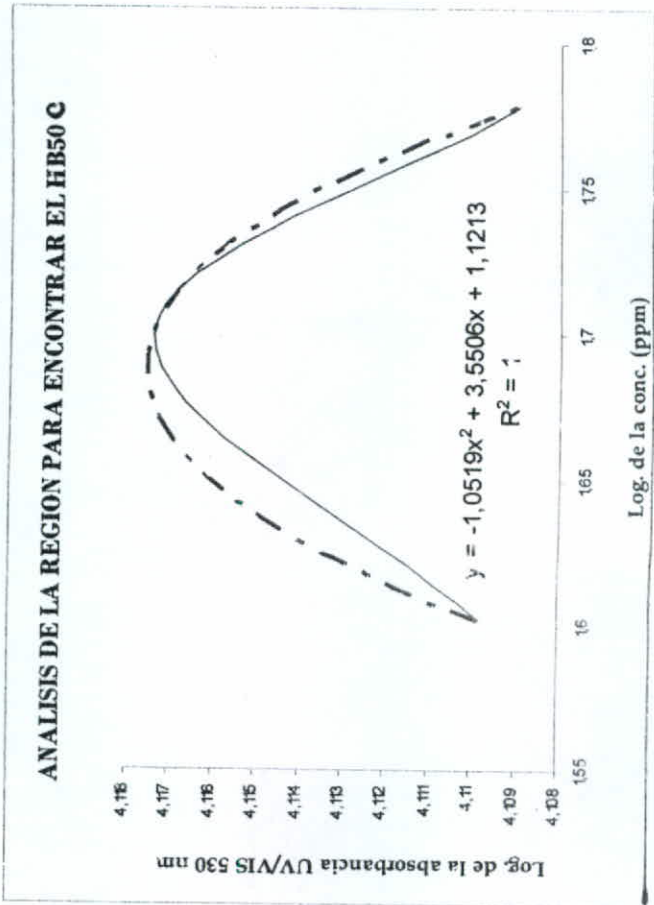
PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

Absorción 575 nm	Absorción 540 nm	Indice de Desnaturalización (%)
0.3504	0.1986	176.6

GRAFICA DE HEMOLISIS MARCA C



ANALISIS DE LA REGION PARA ENCONTRAR EL HB50 C



8.4 ANALISIS DE DATOS MARCA "D"

PROCESO DE HEMÓLISIS

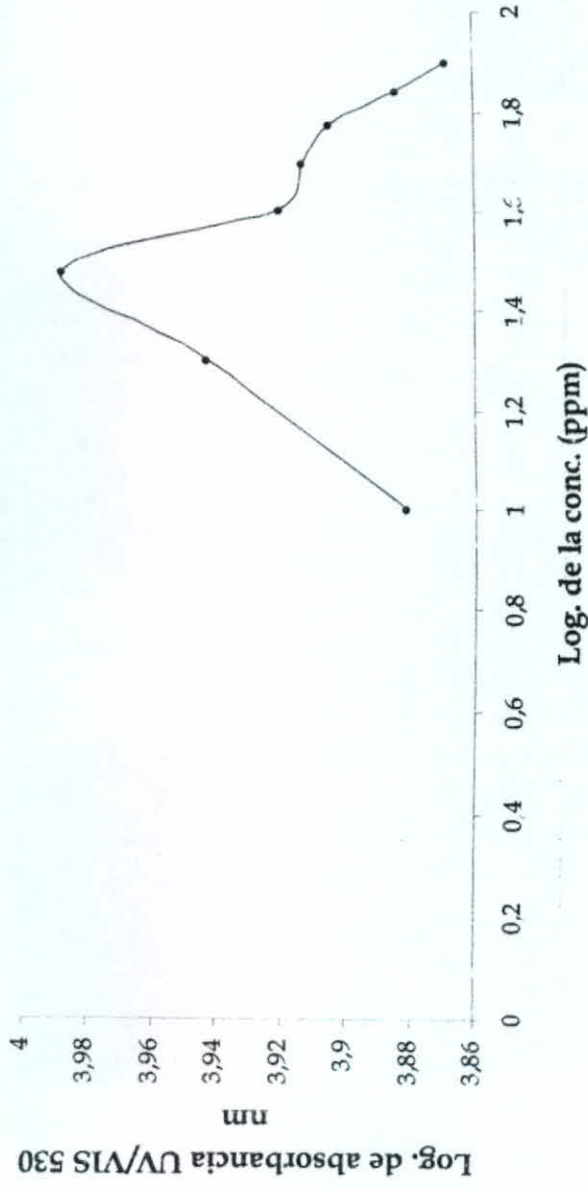
Conc. (ppm)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs 6	Abs 7	Abs 8	Abs 9	Abs 10	Promedio Absorb.	Desviac. Standar	Log conc. (valores X)	Log Abs. (valores Y)
0	98	100	96	98	99	96	99	99	97	98	98	1.28	-----	1.99122608
10	7610	7615	7612	7615	7612	7612	7612	7615	7611	7613	7613	1.67	1	3.88155583
20	8773	8775	8774	8776	8774	8774	8777	8776	8776	8775	8775	1.18	6	3.94324713
30	9733	9733	9734	9732	9730	9730	9733	9730	9734	9732	9732	1.51	5	3.9882021
40	8326	8329	8329	8326	8326	8324	8328	8328	8328	8325	8327	1.64	1	3.92048856
50	8191	8191	8190	8186	8190	8186	8188	8190	8191	8186	8189	2.07	4	3.91325087
60	8028	8028	8023	8027	8029	8030	8027	8027	8028	8028	8028	0.89	5	3.90460736
70	7658	7657	7657	7658	7658	7659	7656	7659	7659	7657	7658	0.97	6	3.88411536
80	7389	7389	7389	7388	7390	7386	7390	7388	7392	7391	7389	1.60	7	3.86858567

HB50 = 27.36

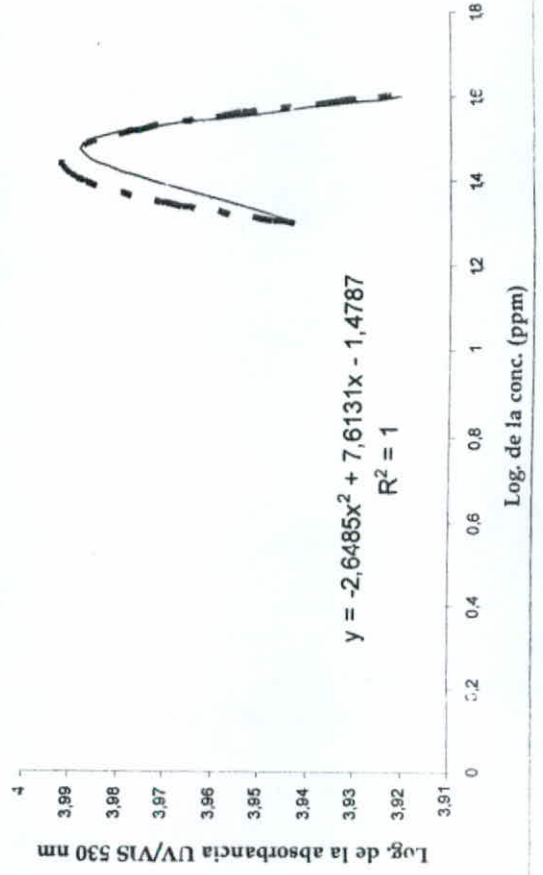
PROCESO DE DESNATURALIZACIÓN

Absorción 575 nm	Absorción 540 nm	Indice de Desnaturalización (%)
0.1075	0.1936	55.54

GRAFICA DE HEMOLISIS MARCA D



ANALISIS DE LA REGION PARA ENCONTRAR HB50 D



8.5 PONDERACION DEL POTENCIAL DE IRRITABILIDAD OCULAR IN VITRO

PRODUCTO (marca comercial)	HB50 (ppm)	ID (%)	RELACION L/D in Vitro	Clasificación in Vitro
Marca "A" (internacional)	68.76	108.75	0.63	Irritante
Marca "B" (internacional)	46.65	32.22	1.45	Moderadamente irritante
Marca "C" (nacional)	48.72	176.6	0.28	Irritante
Marca "D" (nacional)	27.36	55.54	0.49	Irritante

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Según la literatura, la gran mayoría de surfactantes utilizados para la fabricación de champú son irritantes al glóbulo ocular. La propiedad irritante se comprueba al evaluar estos efectos en eritrocitos, ya que éstos en términos bioquímicos se comportan de forma similar al globo ocular.

En esta investigación, se determinó el potencial de irritabilidad ocular de cuatro marcas de champú para bebé aplicando el método de Tolerancia *in Vitro* con eritrocitos. Según los resultados obtenidos, una de las marcas internacionales es moderadamente irritante y las demás resultaron ser irritantes. El valor ID, que indica el índice de desnaturalización de proteínas, es un dato que parcialmente influye en la ponderación irritante o no irritante. Al revisar los resultados, el valor ID más bajo que se obtuvo fue el de la marca que resulto ser moderadamente irritante, lo cual indica que esa marca desnaturaliza las proteínas del eritrocito en un porcentaje bajo. Para las demás marcas, los valores ID fueron variables, siendo así que la marca "C" tiene el más alto índice de desnaturalización, esto se refleja en el alto potencial irritante de ésta marca.

Según éste método, los valores HB50 deben ser altos y los valores ID deben ser bajos o bien los valores HB deben ser mayores a los ID. Eso significa que se necesita una concentración alta de agente surfactante para hemolizar únicamente el 50% de los eritrocitos. Es decir, que al hacer la prueba en el laboratorio, se necesita una cantidad muy alta de producto para que produzca hemólisis en el 50% de la muestra de eritrocitos. Teóricamente esto implica que al necesitar una cantidad grande de producto, la concentración de surfactante contenida es baja o moderadamente adecuada. Al analizar los resultados, los valores HB50 fueron bajos, y al obtener la relación HB50/ID los valores fueron menores a uno, por lo que al correlacionarlos en la escala de Draize éstos valores ubican a los productos como irritantes y moderadamente irritantes.

El valor ID no está directamente relacionado con el HB50. El índice de desnaturalización nos indica la capacidad de una sustancia (en este estudio el surfactante) para desorganizar (desnaturalizar) la estructura nativa de una proteína, en este caso la hemoglobina que forma parte de la estructura molecular de los glóbulos rojos. Diversos agentes y condiciones

desestabilizan la estructura molecular de una proteína, entre ellos: pH, sustancias químicas, agentes caotrópicos y detergentes como lauril sulfato de sodio. Por lo tanto, la desnaturalización es resultado de la destrucción de diversos enlaces que plegan o estabilizan una proteína, las cuales pueden ser: efectos hidrofóbicos, puentes de hidrógeno, interacciones de Van de Waals e interacciones iónicas. En esta investigación, se eliminaron condiciones que favorecieran la desnaturalización y hemólisis de los eritrocitos antes de ponerlos en contacto con las muestras a evaluar, esto se hizo mediante tratamiento previo de la muestra de sangre (ver procedimiento para tratamiento de muestras de sangre), de tal forma que el único agente desnaturalizante en el medio fue el Lauril Sulfato de Sodio que es el principal activo y el que está en mayor concentración en la formulación de los champú. Fue posible comprobar la estabilidad íntegra de los eritrocitos tratados, debido a que cuando se diluyó la muestra de ésta solución madre de eritrocitos en un volumen mayor de buffer isotónico, el color de la solución resultante fue rojo turbio, y no rojo vivo como sucedió al agregar solución madre a las muestras test (ver anexo). El color rojo que se observó en los tubos de análisis fue debido a la hemólisis causada por el surfactante, color que fue proporcionalmente más intenso a la concentración de champú agregada a cada tubo de análisis (ver tablas de resultados para cada marca).

Se han reportado quejas por los usuarios, acerca de la calidad de champú para bebé que se comercializan en Guatemala. Los resultados *in vitro* aplicando éste método, responden a los comentarios, ya que las cuatro marcas más populares, causan irritación ocular, lo cual no coincide con lo declarado en las etiquetas comerciales de éstos productos. Esto se debe al tipo de detergente que utilizan en la fabricación de éstos productos y posiblemente, al alto porcentaje en el que se encuentra en su formulación, los cuales irritan el tejido ocular del bebé, que es delicado y poco desarrollado a esa edad.

Por lo anterior, los resultados obtenidos son confiables y pueden aplicarse para la selección adecuada de estos productos, ya que el análisis se hizo diez veces para cada marca, obteniéndose resultados que no se desvían tanto de la media, pues las desviaciones estándares tienen valores bajos.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se comprobó que de los champú más populares (de manufactura nacional e internacional), ninguno cumple con ser “no irritante a los ojos de los niños”, tal como esta declarado en la etiqueta de dichos productos, por lo que se comprueba la hipótesis planteada.
- 10.2 De las dos marcas evaluadas , ninguna ofrece seguridad absoluta, ya que al ser evaluadas bajo los parámetros de éste método, el valor HB50 obtenido es bajo y el ID es alto, lo cual implica que están calificados como moderadamente irritantes o irritantes.
- 10.3 Según los resultados obtenidos, las dos marcas líderes de champú para bebé que fueron evaluadas, poseen un grado de irritabilidad no aceptable, por lo que no son totalmente seguras para uso en niños.
- 10.4 El método de Tolerancia in Vitro con Eritrocitos, es una herramienta de laboratorio práctica, económica que puede ser de apoyo para las entidades y laboratorios encargados de velar por el cumplimiento de éste parámetro de calidad, en productos de higiene personal, de limpieza y otros, que incluyan surfactantes en su formulación, y que se comercializan en Guatemala.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Evaluar este parámetro de calidad bajo las mismas condiciones empleadas por el método de Tolerancia in Vitro con Eritrocitos y otro método in vitro, con el fin de determinar el valor P, el cual indique diferencias significativas entre ambos métodos.
- 11.2 Determinar el valor L/D de cada una de las marcas evaluadas en este ensayo, utilizando como solución diluyente cloruro de sodio 0.9%, y comparar la diferencia con los valores de absorbancia obtenidos utilizando el buffer de fosfato salino isotónico. Evaluar el grado de liberación de oxihemoglobina según la intensidad de color obtenido.
- 11.3 Proponer al Laboratorio Nacional de Salud (LNS), la alternativa para la aplicación de éste método como una herramienta para la determinación de este parámetro, tan necesario en este grupo de cosméticos a los cuales se les debe prestar atención, debido al usuario al que está destinado.

12- REFERENCIAS

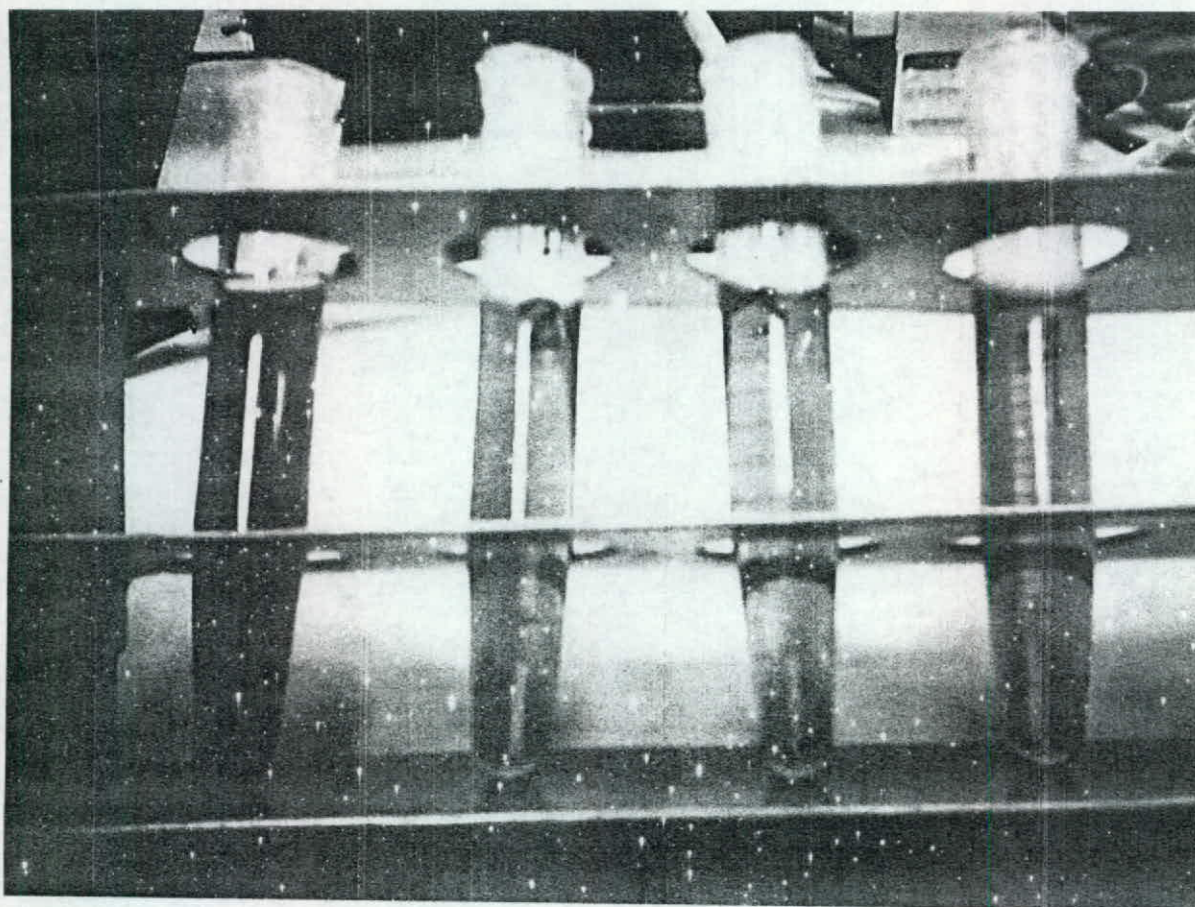
1. Aguirre M., Ileana Patricia. 1991. EVALUACIÓN DE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE SOLUCIONES OFTÁLMICAS MANUFACTURADAS POR LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA NACIONAL EN FUNCIÓN DEL PH, ESTERILIDAD E ISOTONÍA. Guatemala. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
2. Alfonso R. et.al. FARMACIA REMIGTON. 14ª edición. Médica Panamericana Buenos Aires/Argentina. 1970. Pp. 1562.
3. Dumas D. Jaque Humbet Jean. 1998. INFLUENCIA DEL COLESTEROL EN MEMBRANAS SOBRE LA DEFORMIDAD Y LA FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA. Buenos Aires. 32(2): 261-275.
4. Gramajo, et.al. 1995. FARMACIA REMIGTON. Edición No. 19. Buenos Aires/Argentina. Editorial Médica Panamericana. Tomo I. pp. 906-909.
5. Gieck Kart. MANUAL DE FORMULAS TECNICAS. 19ª edición. Marcombo Alfaomega. México. 1993. Pp.: 74.
6. Helman A. José. Farmacotécnica Teórica y Práctica. 3ª edición. Editorial Continental. Tomo II, VI, VII. 1984.
7. Harry Ralph G. The principles and practice of Modern Cosméticos. Vol. I. 1962. pp 46-52.
8. Lachman Lieberman, K. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3a edición. Lea & Febiger. Estados Unidos/Philadelfia.. 1986. pp. 902-912.

9. Maisson G. The Chemistry and manufacture of Cosmetics. 2a edición. Allured Publishing Corporation. New York. 1993. Tomo IV.
10. Marcial I. Quiroa y Carlos F. Guillot. Cosmética Dermatológica. 4ª edición. Buenos Aires/Argentina. 1979. Vol. I. pp. 10-25.
11. Michael e Irene Ash. A formulary of Cosmetic Preparations. Chemical Publishing Co. New York. 1977. Pp. 27.
12. Molina Salan, Amalia Elizabeth. 1999. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA DE LOS SHAMPÚS PARA CABELLO NORMAL QUE SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA. Guatemala. 41 pp. Tesis Licenciada en Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
13. Murillo Jorge, Gisella et. al. 2004. Incorporación de dos Métodos alternativos para evaluar irritación ocular en un laboratorio de toxicología. Centro de Toxicología y Biomedicina, Instituto Superior de Ciencias Médica. Revista Cubana de Farmacia (Santiago de Cuba). 38(3).
14. Oliva de Vargas, Vilma Susana. 1965. EVALUACIÓN DE LOS SHAMPÚS QUE SE COMERCIALIZAN EN GUATEMALA. Guatemala. 43 pp. Tesis Licenciada en Químico Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química Farmacéutica.
15. Pérez de R. Maria N. Cosmética Capilar II. Editorial Amigos. Caracas. 1994.
16. The Unite States Pharmacopea USP XXIII. Estados Unidos . 1995. Tomo I y II.

17. Vallejo, J.J. et.al. 2004. Prueba de Tolerancia in Vitro con eritrocitos para medir el potencial de irritabilidad de los surfactantes. *Revista Vital* . (Colombia). 11(1):49-54. Universidad de Antioquia, Medellín, facultad de Química Farmacéutica.
18. Valk Jan Van, et.al. 1999. Alternatives to the use of animals in higher education. *Revista Atlas* . Colombia. No. 27. pp: 39-52.
19. Viglioglia Pablo A. Y Jaime Rubin. *Cosmiatria II*. 3a edición. Ediciones Cosmiatria. Buenos Aires/ Argentina. 1993. Pp: 125-127.
20. W. J. P. Hoppe. 1991. Standarization of an in vitro Red Blood Cell Test for Evaluating the Acute Citotoxic Potential of Tensides. *Revista Drug research*. (Argentina). 40(1): 4,498-502.
21. Waggoner, William C. et al. 1990. Human ocular Irritation, Clinical Safety and Efficacy . *Revista Testing of Cosmetic*. Universidad Alemana. Pp: 74-82.
22. Westman Mort A. 2003. New Shampoo Technologies. *Revista Cosmetics & Toiletries*. New Jersey , EE.UU. 5(118):57-64.
23. www.Colipa.com/alternatives.html.
24. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-hd03.html> (Cosmetic Handbook. Cosmetic Product-Related Regulatory Requirements and Health Hazard Issues. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition FDA/IAS* Booklet: 1992)
25. <http://www.espanol.new1.yahoo.com>
26. <http://.enciclonet.com>
27. www.haarmann-reimer.com
28. www.TheCosmeticSite.com

13. ANEXOS

13.1 Tubos con Muestras para Análisis



Tubos con muestras de análisis: tubo 1: muestra de sangre en solución isotónica, tubo 2, 3 y 4: muestra de sangre en solución concentrada de champú, cada vez en mayor porcentaje.

13.2 TEST DE DRAIZE

Test de Draize (inventado por John Draize) se utiliza principalmente sobre conejos albinos (dóciles, baratos y de grandes ojos) para pruebas de cosméticos. Se divide en:

1. Draize Skin Test (Test de piel de Draize): se afeita el pelo del lomo de los animales y se aplica un esparadrapo sobre la piel, que se quita bruscamente. Se repite hasta que la piel es despegada, quedando en carne viva. Sobre la carne se echa el cosmético a probar (jabones, geles, desodorantes y lociones) y se cubre. Se observa durante unos 10 días, estudiando las llagas, abriéndolas y cerrándolas de nuevo.
2. Draize Eye Test (Test de ojos de Draize): este ensayo permite evaluar los efectos oculares que aparecen por la exposición aguda de los compuestos sobre la mucosa ocular del conejo, mediante la observación de las reacciones que ocurren a nivel de córnea, iris y conjuntiva, y de acuerdo con el sistema de Draize para evaluar la severidad de las lesiones oculares producidas, es posible clasificar los compuestos en cuanto a su potencial irritante. Se procede sujetando los ojos con un clip, se vierte o inyecta la sustancia a probar sobre uno de ellos -en el saco conjuntival y en la córnea- dejando el otro intacto para comparar. La primera reacción es un abundante lagrimeo. Con los días, la córnea, el área y la conjuntiva van cambiando; el conjunto se irrita, enferma y va quemándose y corroyéndose por la sustancia. El ojo se convierte poco a poco únicamente en dolor, y se queda ciego, hinchado y lleno de pus. Entonces es extirpado y examinado, en algunos casos con el animal vivo, para usar el otro ojo

Los resultados de este ensayo han sido usados durante años para la clasificación de diferentes compuestos y han constituido la base de la norma No. 405 adoptada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) en 1981 y de la norma ISO/DIC-10 993 No.10 adoptada en 1992 para la conducción de los ensayos de toxicidad.

Diversos estudios han demostrado que éstos test son ineficaces. Los ojos del conejo albino tienen una ultraestructura tisular, una bioquímica y unos mecanismos de secreción lagrimal diferentes de los humanos. Además, existen más de 60 métodos alternativos. Aún así, se usan porque son una manera rápida de conseguir una licencia.



Procedimiento Test de Draize.

Modificaciones propuestas al ensayo de Draize

Inicialmente Draize utilizó 9 animales, sin embargo, la FHSA (Federal Hazardous Substances Act) recomienda el uso de 6 animales para la prueba. Las normas de la OCDE recomiendan un mínimo de 3 animales y 1 animal adicional siempre que se requiera, y su más reciente modificación incluye el uso de un solo animal si se sospecha que el producto es altamente irritante.⁷

Otras modificaciones incluyen una disminución en el volumen del material de ensayo, debido a que se encuentra por encima del rango de cualquier exposición en humanos y resulta superior a la capacidad del ojo del conejo que es aproximadamente de 30 a 50 μL .

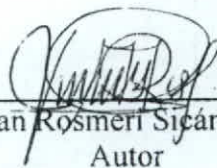
Métodos alternativos al ensayo de irritación ocular con el test Draize

Los métodos alternativos incluyen a todos aquellos procedimientos que pudieran remplazar los experimentos realizados con animales, reducir el número de estos a utilizar en cada ensayo o refinar la metodología ya existente en busca de una disminución del dolor y el estrés, lo que se corresponde con el principio de las "tres erres". Los métodos alternativos hasta ahora propuestos son los siguientes:

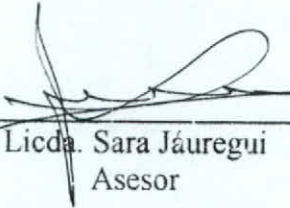
1. Los estudios que utilizan la evaluación morfológica o la observación que refleja los cambios morfológicos a nivel celular: el ensayo del ojo aislado del conejo, el cual es selectivo para irritantes severos. En este ensayo el efecto tóxico de las sustancias es estimado por la aplicación de estas sobre la córnea. Los efectos son medidos 4 h después del tratamiento donde la presencia de opacidad corneal, la medición del grosor de la córnea, el daño a nivel del epitelio corneal y la penetración de la fluoresceína a través de la córnea constituyen los puntos finales del ensayo para la determinación del efecto tóxico de los compuestos
2. En el segundo grupo de estudios se encuentran los ensayos de toxicidad celular, y dicho término incluye no solo letalidad celular sino también disfunción celular. Esta categoría puede ser dividida en 3 subgrupos: ensayos de adhesión y proliferación celular, ensayos de integridad de membrana y ensayos de metabolismo celular. Numerosos ensayos utilizan la proliferación celular como indicador de citotoxicidad; el ensayo para la determinación de proteínas totales en células 3T3 de ratón Balb, utiliza este parámetro como punto final, y mediante una reacción colorimétrica es posible establecer una curva dosis-efecto y así determinar la concentración del irritante que causa el 50 % de una disminución de las proteínas totales.
3. Existe otro gran grupo de pruebas que emplean los efectos sobre la integridad de membranas para evaluar la citotoxicidad, dentro de estas el ensayo de las células rojas sanguíneas. Se basa en la propiedad de ciertos compuestos químicos que pueden causar daños sobre la membrana plasmática y/o desnaturalización de proteínas de membranas y otras proteínas de diferentes células. Una vez obtenida la concentración efectiva media, o sea, la que causa el 50 % de hemólisis y el índice de desnaturalización, se calcula el índice de irritación mediante una relación entre ambas variables cuyo valor se compara en una tabla para clasificar las sustancias.
4. Varios aspectos del metabolismo celular han sido investigados como base para la evaluación de la toxicidad, uno de los más representativos lo constituye el ensayo de la acumulación del colorante rojo neutro. Dicho ensayo utiliza las células 3T3 de ratón como indicio de citotoxicidad. La cantidad de colorante absorbido es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Se determina la concentración que provoca una reducción del 50 % en la retención del rojo neutro mediante curvas dosis-respuesta, usadas como medida de citotoxicidad debido a la capacidad que poseen los compuestos irritantes de romper las células y provocar la salida del rojo neutro.

5. Otro grupo de ensayos permiten definir la respuesta fisiológica a nivel celular y de tejido: el ensayo para la determinación de la conductividad eléctrica en muestra de epidermis de ratas Wistar , el cual está basado en mediciones de la resistencia eléctrica a muestras de piel previamente expuestas al material de ensayo y cuyo valor constituye un indicador de la integridad del estrato córneo de la piel, donde una vez que se define que el material de ensayo es irritante en piel se asume que resulta severamente irritante en el ojo.
6. El método de la determinación de la opacidad y permeabilidad en córnea bovina aislada, utiliza estas 2 variables como punto final para la estimación de las propiedades irritantes de las sustancias. La opacidad es medida mediante el cambio en la transmisión de la luz que pasa a través de la córnea mediante un opacitómetro, y la permeabilidad es medida espectrofotométricamente a 490 nm sustituyendo el material de ensayo por fluoresceína.
7. Existen estudios que utilizan la membrana corioalantoidea; se asume que los efectos irritantes agudos sobre los vasos pequeños y las proteínas de membrana de este tipo de tejido son similares a los efectos inducidos en el ojo por el mismo químico.
8. Existen otros ensayos que no se encuentran dentro del esquema de clasificación propuesto, que incluyen sistemas computacionales basados en la relación estructura-actividad y pueden ser considerados como alternativa fiel y eficaces al ensayo de irritación ocular: en este grupo se encuentra el ensayo de EYTEX. Este método permite evaluar la irritación ocular basado en la capacidad que poseen las proteínas de unirse a una matriz sintética provocando turbidez, la cual es directamente proporcional a la irritación de la muestra.

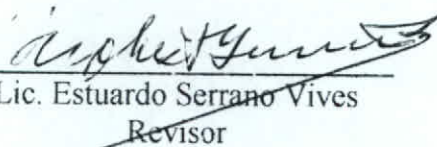
Estos métodos alternativos presentan grandes ventajas, ya que pueden ser utilizados como métodos de screening, para evaluar las potencialidades tóxicas de nuevas formulaciones, son métodos sensibles donde las condiciones experimentales pueden ser definidas, controladas, reproducidas y estandarizadas con gran rigurosidad, " más baratos" y éticos.



Vivian Rosmeri Sicán López
Autor



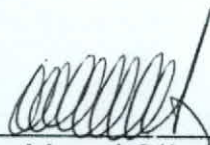
Licda. Sara Jáuregui
Asesor



Lic. Estuardo Serrano Vives
Revisor



Licda. Lillian Irving Antillón, M.A.
Directora



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Decano