





# **Universidad Norbert Wiener**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA IRRITABILIDAD OCULAR IN VITRO MEDIANTE EL  
MÉTODO HET-CAM EN CREMAS PARA CONTORNO DE OJOS CON Y SIN  
REGISTRO SANITARIO QUE SE COMERCIALIZAN EN EL DISTRITO DE LA  
VICTORIA, LA PARADA - LIMA.”**

## **TESIS**

Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico que presenta las Bachilleres:

## **AUTORAS**

Br. Celestino Ramirez Fiorela Victoria

Br. Llacsá Quispe Luz Marina

## **ASESOR**

QF. TOX. Lizano Gutiérrez Jesús Víctor

Lima, 23 de Mayo del 2018

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por brindarme la fuerza necesaria para llegar a este momento y seguir por mis objetivos, a mis padres Maximiliano y Martina que estuvieron apoyándome en cada instante en el largo transcurso de la vida universitaria, a mis hermanos con su gran apoyo que a su vez me motivaban a seguir adelante a pesar de las dificultades.*

*A mis amigos que compartieron sonrisas y trabajo en equipo que hicieron que la universidad sea menos estresante más aun cuando el trabajo y estudio se combinan.*

*A los profesionales químicos farmacéuticos que contribuyen y me apoyaron en mi formación profesional con consejos y recomendaciones sobre la carrera..*

*Para ellos la dedicatoria de mi tesis pues es a ellos a quien se los debo.*

*Gracias*

*Br. Llacsa Quispe Luz Marina*

## **DEDICATORIA**

*Durante el desarrollo de esta tesis se presentaron diversidad de situaciones que pudieron ser fácilmente causantes del fracaso de esta, pero esto no sucedió, y fue gracias al apoyo presentado por diversas personas, en especial a mi madre, hermanas y enamorado que gracias a ellos este sueño se pudo hacer realidad, porque en todo momento estuvieron atentos a todas nuestras necesidades y requerimientos para el desarrollo con excelencia de esta tesis.*

*Gracias a Dios por permitirme tener una familia que siempre creyó en mí, por ser la motivación cada día para llegar más lejos en mi vida y carrera profesional.*

*Br. Celestino Ramirez Fiorela Victoria*

## AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento sincero a los distinguidos miembros del Jurado Examinador y Calificador del presente trabajo de investigación, conformado por:

Presidente: Dr. Enrique León Soria

Miembros: Mg. Villanueva Vílchez Hugo

QF. Cárdenas Orihuela Robert Armando

QF. Ramos Jaco Antonio Guillermo

Por sus notables conocimientos y aportes brindados para la elaboración y culminación del presente trabajo.

A mi asesor: QF. TOX. Lizano Gutiérrez Jesús Víctor, por su apoyo incondicional, por brindarme sus comentarios, sugerencias y continuo apoyo a lo largo de la realización del presente trabajo de investigación.

A los miembros del laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener que contribuyeron en la realización de la tesis.

## RESUMEN

La presente investigación, proporciona datos científicos sobre los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), para evaluar en cremas cosméticas para contorno de ojos con y sin registro sanitario.

El objetivo es comparar el nivel de irritabilidad de las cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario de diferentes marcas. Las cremas analizadas fueron 5 con registro sanitario y 5 sin registro sanitario. Las cremas mencionadas fueron adquiridas en el distrito La Victoria, Parada por la demanda de distribuidores de productos de belleza y el aseo personal. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener. (UNW).

La metodología utilizada se basa en el protocolo N° 108 de las técnicas in vitro en Toxicología (INVITTOX), que consiste en el estudio de la reacción de variantes de ensayos sobre la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular.

Los resultados de la irritación potencial de diez formulaciones de cremas para contorno de ojos nos indica que las cremas sin registro sanitario son altamente irritantes para el contorno de ojos por lo cual presenta un 80% de riesgo para las de personas que lo utilizan, mientras que las cremas con registro sanitario tienen una irritabilidad baja y representa un 10% de riesgo.

Palabras clave: HET-CAM, CAM-TBS, Prueba de irritabilidad ocular, Cremas cosméticas, Membrana corioalantoidea.

## ABSTRACT

The present research provides scientific data on the qualitative HET-CAM and quantitative HET-CAM (CAM-TBS) methods to evaluate cosmetic creams for eye contour with and without sanitary registration.

The objective is to compare the level of irritability of eye contour creams with and without sanitary registration of different brands. The creams analyzed were 5 with sanitary registration and 5 without sanitary registration. The creams mentioned were acquired in the district of La Victoria, Stopped by the demand of distributors of beauty products and personal hygiene. The analyzes were carried out in the laboratory of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the Norbert Wiener University. (UNW)

The methodology used is based on the protocol No. 108 of the in vitro techniques in Toxicology (INVITTOX), which consists in the study of the reaction of test variants on the chorioallantoic membrane of the egg of the hen for the evaluation of ocular irritation.

The results of the potential irritation of ten formulations of eye contour creams indicate that creams without a sanitary registration are highly irritating to the eye contour, which presents an 80% risk to those of people who use it, while the creams with sanitary registry have a low irritability and represent a 10% risk.

Key words: HET-CAM, CAM-TBS, Ocular irritability test, Cosmetic creams, Chorioallantoic menbrana.

## INDICE

RESUMEN

SUMMARY

Lista de Tablas

Lista de Gráficos

Lista de Figuras

Lista de Anexos

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
	1.1. Objetivos: .....	3
	1.1.1. General: .....	3
	1.1.2. Específicos:.....	3
	1.2. Justificación:.....	4
II.	MARCO CONCEPTUAL.....	4
	2.1. Antecedentes.....	4
	2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	4
	2.1.2. Antecedentes Nacionales .....	7
	2.2. BASES TEORICAS .....	10
	2.2.1. Anatomía del ojo Humano .....	10
	2.2.2. Membrana corioalantoidea (CAM).....	11
	2.2.3. Irritación Ocular: Mecanismos Implicados.....	11
	2.3. Uso de cremas cosméticas para contorno de ojos.....	12
	2.3.1. El Contorno de los ojos y la Importancia de las Cremas cosméticas a utilizar.....	12
	2.4. Análisis comparativo de productos cosméticos con registro sanitario y productos sin registro sanitario.....	13

2.5. Consecuencias de la toxicidad de las cremas .....	14
2.6. Pruebas utilizadas para la evaluación de la irritabilidad de productos cosméticos .....	19
2.6.1. Prueba de Irritación Ocular de Draize .....	19
2.6.2. Métodos Alternativos para Valorar la Irritación Ocular.....	20
2.6.2.1. Métodos Alternativos.....	20
2.6.2.2. Ensayos de Irritabilidad ocular in vitro.....	20
2.6.2.3. Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Método HET-CAM). .....	21
2.6.2.4. Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA) .....	22
2.6.2.5. Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS).....	23
2.7. Método HET- CAM-Cualitativo .....	24
2.7.1. Desarrollo del método.....	24
2.7.2. Validación del Método HET-CAM .....	25
2.7.3. Las 3 reacciones a determinar en la membrana coriolantoidea .....	25
2.7.3.1. Coagulación .....	25
2.7.3.2. Lisis.....	26
2.7.3.3. Hemorragia .....	26
2.7.4. Ventajas y Desventajas de los Ensayos CAM .....	26
<b>III PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>28</b>
3.1. Métodos: Método HET CAM.....	28
3.1.1. Tipo de estudio.....	28
3.1.2. Materiales y métodos .....	28
3.1.2.1 Equipos .....	28
3.1.2.2. Materiales.....	29
3.1.2.3 Muestras, reactivos y solventes.....	29
3.2. Representación gráfica del estudio .....	30

3.3. Obtención de muestras.....	31
3.3.1 Cálculo de tamaño de muestra por crema .....	32
3.4. Evaluación de la irritabilidad ocular en las cremas para contorno de ojos HET-CAM cualitativo.....	34
3.4.1. Incubación de los huevos de la gallina .....	34
3.4.2. Verificación del crecimiento del embrión.....	34
3.4.3. Preparación de la CAM.....	34
3.4.4. Exposición de la membrana a los controles y formulaciones cosméticas .....	36
3.5. Método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS) .....	37
IV. RESULTADOS .....	39
4.1. Resultados método HET-CAM de indicadores – controles.....	39
4.2. Resultados del HET-CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario.....	42
4.3. Método de la CAM mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS) ....	51
4.4. Resultados método CAM- TBS de indicadores y controles .....	52
4.5. Resultados del (CAM-TBS) cuantitativo en cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario.....	56
4.6. Comparativa de resultados HET CAM y CAM -TBS de controles y cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario.....	58
V DISCUSION .....	60
VI CONCLUSIONES.....	62
VII RECOMENDACIONES .....	63
VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS .....	76

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de formulaciones para contorno de ojos con y sin registro sanitario.	31
Tabla 2. Los valores de $Z\alpha$ más utilizados y sus niveles de confianza.....	32
Tabla 3. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante el método HET- CAM.....	37
Tabla 4. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS .....	38
Tabla 5. Datos obtenidos de los controles del método HET- CAM – Controles.....	40
Tabla 6. Resultados obtenidos de los controles del método HET- CAM cualitativo– Controles.....	41
Tabla 7. Resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con registro sanitario .....	44
Tabla 8. Resumen de resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con registro sanitario .....	47
Tabla 9. Resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos sin registro sanitario .....	47
Tabla 10. Resumen de resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos sin registro sanitario .....	50
Tabla 11. Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida .....	51
Tabla 12. Datos obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio. ....	52
Tabla 13. Resultados obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio. ....	54
Tabla 14. Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio.....	55

Tabla 15. Resultados Finales obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.....	56
Tabla 16. Resultados Finales obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.....	57
Tabla 17. Comparativa de resultados HET CAM y CAM-TBS en controles Positivos, blanco y solventes.....	58
Tabla 18. Comparativa de resultados HET CAM y CAM-TBS de cremas para contorno de ojos con y sin registro sanitario .....	59
Tabla 19. Datos obtenidos de muestras con Registro Sanitario - Cualitativo.....	76
Tabla 20. Datos obtenidos de muestras sin Registro Sanitario - Cualitativo.....	81
Tabla 21. Datos Obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario. ....	84
Tabla 22. Resultados del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario. ....	89
Tabla 23. Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.....	94
Tabla 24. Datos Obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.....	96
Tabla 25. Resultados del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario. ....	100
Tabla 26. Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la anatomía del ojo. En la parte superior (a) se muestra la localización de la conjuntiva que descubre la parte externa del globo ocular y la cara interna de los párpados. También se muestran todas las estructuras que forman el globo ocular (B) y la organización histológica de la cornea (c). .....	11
Figura 2. Esquema de estudio de la metodología .....	30
Figura 3. Incubadora utilizada para la conservación de huevos. ....	34
Figura 4. Presencia del embrión. ....	34
Figura 5. Huevos para la preparación de la CAM .....	35
Figura 6. Preparación de la CAM. En la imagen a) Muestra la preparación de la membrana primero se recorta la cáscara de huevo. b) Se retira la primera membrana blanquecina c) Se exponerá la CAM. ....	35
Figura 7. Adicionar 0.3 mL de la solución de la solución al 2%. ....	36
Figura 8. Reposo en la membrana corioalantoidea de la solución de la crema. ....	36
Figura 9. a) Evaluación del efecto del suero fisiológico se observa que no presenta daño alguno, b) Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0.1 N en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia. ....	39
Figura 10. a) Evaluación del efecto del etanol se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia, b) Evaluación del efecto del Lauril sulfato de sodio 1% en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia. ....	39
Figura 11. a) Evaluación del efecto de la Crema Portugal Q10 contorno de ojos se observa que presenta lisis, b) Evaluación del efecto de la Crema Cicatricure contorno de ojos en la CAM presenta lisis en poco tiempo. ....	42

Figura 12. a) Evaluación del efecto de la Crema Barbaria contorno de ojos se observa que presenta lisis. b) Evaluación del efecto de la Crema Nívea Q10 contorno de ojos en la CAM, presenta lisis. c) Evaluación del efecto de la Crema contorno de ojos Ponds se observa que presenta lisis en poco tiempo. ....	42
Figura 13 . a) Evaluación del efecto de la Crema Concha de Nácar se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia. b) Evaluación del efecto de la Crema de Sábila en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia.....	43
Figura 14. a) Evaluación del efecto de la Crema de Baba de caracol se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia, b) Evaluación del efecto de la Crema Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia. c) Evaluación del efecto de la Crema de Aloe vera y Extracto de Pepino. Se observa que presenta daño lisis, mayor coagulación y hemorragia.....	43
Figura 15. Huevos fértiles de gallina criolla adquiridos en la parada, ala derecha .....	107
Figura 16. Huevos con colorante azul de tripán, ambos de la crema Cicatricure, mostrando la absorción del colorante en el tejido de la membrana corioalantoidea. ....	107
Figura 17 Correcto lavado con agua destilada.....	108
Figura 18. Crema Concha de Nácar.....	108
Figura 19 . Crema de Sábila.....	108
Figura 20. Crema de Baba de caracol. ....	108
Figura 21. Crema Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera. ....	108
Figura 22. Muestras de cremas sin registro. ....	109
Figura 23. Crema Cicatricure contorno de ojos.....	109
Figura 24. Crema Portugal Q10 contorno de ojos. ....	109
Figura 25. Muestras de crema Babaria. ....	109

Figura 26. . Muestras de cremas Nivea.....	109
Figura 27. Ensayo con la crema Cicatricure. ....	110
Figura 28. . Ensayo con la crema Portugal. ....	110
Figura 29. Soluciones Preparadas al 2% de cada crema.....	110
Figura 30. Imagen de la CAM en los tubos de propileno , al agregarle la formamida...110	
Figura 31. Pesado de la CAM.....	111
Figura 32. Preparación de las Soluciones de las cremas contorno de ojos. ....	111
Figura 33. Preparación de soluciones de controles, con los debidos materiales de bioseguridad. ....	112
Figura 34. Autoras de la Tesis. ....	112

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Grafico 1. . Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida.....	51
--	----

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO 1. Resultados obtenidos por el número de muestras del método HET-CAM cualitativo de cremas con y sin registro .....	76
ANEXO 2. Resultados obtenidos del método CAM-TBS por el número de muestras cuantitativo de cremas con y sin registro .....	84
ANEXO 3. Imágenes de la parte experimental.....	106
ANEXO 4. Muestras de cremas sin registro sanitario .....	108
ANEXO 5. Muestras de cremas con registro sanitario.....	108
ANEXO 6. Procedimiento experimental .....	110

## I. INTRODUCCIÓN

El hombre tiene conocimiento del mundo físico que le rodea mediante los órganos de los sentidos; dentro de ellos, el ojo ocupa un lugar preponderante por su capacidad de capturar la energía visible y convertirla en neuroseñales que se transmiten a través del nervio óptico hacia el cerebro donde se produce la visión.<sup>1</sup>

Sin embargo, la vista se encuentra constantemente expuesta al ambiente, y vulnerable al ataque de cualquier agente físico o químico que puede ocasionar alteraciones, daño o pérdida de la visión en dependencia del grado de severidad que causa la crema contorno de ojos. Por tales motivos resulta esencial estimar lo más rigurosamente posible el potencial irritante de cualquier compuesto que pueda tener contacto con el ojo y sus estructuras adyacentes.<sup>2</sup>

En Lima se observa una poca o nula información sobre la oferta de cremas cosméticas para el contorno de ojos que humecte, nutra y rejuvenezca. Esta reducida información de cremas cosméticas hace que las personas utilicen cremas que, aunque cuentan con registro sanitario, tienen bases químicas que traen consecuencias médicas graves como irritaciones, inflamación, quemaduras, ampollas y, a largo plazo, pueden causar cáncer. Lo anterior se agrava con la presencia de una gran variedad de cremas sin registro sanitario que se ofrecen en el mercado informal y cuyos componentes son más tóxicos que los anteriores.

La piel de la franja periorbital (alrededor de los ojos) es la más frágil y sensible de toda la cara lo cual la hace extremadamente frágil y fina. Por este motivo el ojo puede ser afectado accidentalmente por la utilización de diversos productos de uso cotidiano, este es el caso de la utilización frecuente de cosméticos con componentes químicos para maquillaje, como ha quedado demostrado en diversos estudios. Esto ha encendido las alarmas en el escenario mundial.<sup>3</sup>

Un hito en esta preocupación, fue lo que sucedió con una ciudadana norteamericana que, en 1933, quedó ciega por el uso de una máscara de pestañas que contenía parafenilendiamina, una sustancia química capaz de ocasionar blefaritis alérgica, queratoconjuntivitis crónica y queratitis bacteriana. Este hecho y otros que dejaron secuelas graves en la salud de las personas, generó que el congreso norteamericano promulgara la Federal Food Drug And Cosmetic Act (1938) que atribuía a los productores la responsabilidad sobre sus productos cosméticos.<sup>4</sup>

Para posibilitar la seguridad de los consumidores se requiere analizar el potencial de irritación ocular de estas sustancias químicas. Esta estimación está basada en los resultados alcanzados en el ensayo de Draize realizados en conejos en 1944. Es destacable, que los progresos en el desarrollo de la toxicología in vitro han posibilitado la utilización de algunas alternativas para la evaluación del riesgo ocular sin sacrificar animales.<sup>5</sup>

En relación a la evaluación del riesgo de los productos químicos, se plantea la ejecución de nuevos métodos de evaluación toxicológica. Las pruebas toxicológicas, in vitro, han sido utilizadas históricamente en la evaluación de la inocuidad y seguridad de los ingredientes de cosméticos.

En la actualidad, múltiples laboratorios a nivel mundial vienen incorporando el ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (hen's egg test chorioallantoic membrane, HET-CAM) para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos; por su rapidez, simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y su relativo bajo costo.<sup>6</sup>

La legislación mundial, norma que la investigación científica incorpore toxicidad o funcionalidad de los productos cosméticos, evaluados con métodos alternativos al uso de animales experimentales. En nuestro país, la utilización de métodos alternativos para evaluar toxicidad todavía es escasa.

El método HET CAM para evaluar irritabilidad, es novedoso aún en nuestro medio donde recientemente se viene implementando en los laboratorios de investigación y aun es inexistente en las empresas farmacéuticas, por lo cual consideramos relevante este estudio de implementación de esta técnica.

Por lo tanto el objetivo de este estudio es Comparar el nivel de irritabilidad ocular entre cremas para contorno de ojos con registro sanitario y sin registro sanitario con la prueba de irritabilidad ocular in vitro, mediante el método HET-CAM cualitativo y cuantitativo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de Tripán(CAM-TBS, Chorioallantoic Membrane-Trypan Blue Staining por sus siglas en inglés). La tendencia europea para obtener productos cosméticos con ingredientes no irritantes, se ha convertido en una influencia mundial; por lo cual, se busca que los ingredientes dentro de la fórmula sean de origen natural y no irritantes para el ser humano. Debido a esta tendencia, la industria cosmética se encuentra en la búsqueda de ingredientes de origen vegetal para incorporarlos en sus formulaciones; sin embargo son escasos los estudios realizados con extractos de frutos nativos, a nivel de seguridad y eficacia de estos productos cosméticos.<sup>7</sup>

## **1.1. Objetivos:**

### **1.1.1. General:**

- Determinar el índice de irritabilidad ocular in vitro mediante los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cremas cosméticas (contorno de ojos) con registro sanitario y sin registro sanitario.

### **1.1.2. Específicos:**

- Comparar el nivel de irritabilidad ocular entre cremas con registro sanitario y sin registro sanitario.
- Determinar cualitativamente la proporción de daño en el tejido ya sea lisis, hemorragia o coagulación.
- Determinar la cantidad de tinción de azul de tripán adsorbido del tejido dañado en el análisis cuantitativo.

## **1.2. Justificación:**

La importancia de este trabajo de investigación que puede ser en cierta medida pionero en nuestro medio consiste en comprobar como el método HET- CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) determinará el índice de irritabilidad de las cremas cosméticas (contorno de ojos) con registro sanitario y sin registro sanitario que se comercializan en el distrito de La Victoria, La Parada- Lima. Con ello, este estudio estaría aportando al desarrollo en nuestro país de ensayos con métodos alternativos para evaluar los efectos de las cremas cosméticas mayoritariamente con componentes químicos irritantes que se consumen en el mercado sin darle la mayor importancia por parte de la población.

En este camino, este estudio va a servir para sensibilizar principalmente a las mujeres que son las principales consumidoras de cosméticos en nuestro país a preferir cremas cosméticas con registro sanitario que no tengan efectos tóxicos en la salud humana y evaluar la compra masiva de cremas sin registro sanitario que se venden a gran cantidad. Además, de realizarse una investigación de acuerdo a las exigencias de la legislación más avanzada sobre el tema.

## **II. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.1. Antecedentes**

#### **2.1.1. Antecedentes Internacionales**

Batistas Et al (2010), en su investigación “Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCO1 por el método de HET-CAM.”, tuvo como objetivo evaluar si el adyuvante vacunal AFCo1, un cocleato obtenido a partir del proteo liposoma de Neisseria meningitidis, produce irritación directa en la mucosa nasal, para lo cual se estudió el efecto de su aplicación en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo

(MCA), por la técnica de HET-CAM (hen's egg test on chorioallantoic membrane), según el Protocolo 47 de INVITTOX, método alternativo que sustituye la clásica prueba de Draize en conejos. En dicha investigación estos ensayos se utilizaron por cada producto a evaluar (AFCo1 o amortiguador fosfato salino como diluyente) tres huevos de gallinas White Leghorn de 10 días de embrionados; para los controles positivos de irritación (NaOH a 0,1 N y SDS al 1%) se utilizaron dos huevos para cada uno. Los productos fueron aplicados en la MCA para evaluar las lesiones de lisis, hemorragia y coagulación, a los 5 min. Las sustancias se clasificaron según una escala establecida para productos no transparentes. Adicionalmente se realizó una evaluación microscópica de las MCA tratadas para confirmar las observaciones realizadas. Como resultado se obtuvo que, al determinar el grado de severidad de las tres reacciones, después de la aplicación de AFCo1 y del diluyente, ambos clasifican como no irritantes, lo que evidencia que este cocleato no produce lesión epitelial directa. Este resultado, además, confirma la utilidad del HET-CAM para la determinación de irritabilidad nasal de adyuvantes vacúnales.<sup>7</sup>

González, Et al (2006). En su investigación titulada: Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método *in vitro* en sustitución de la prueba en conejos, tuvo como objetivo la evaluación de la irritabilidad oftálmica de tres cremas cosméticas desarrolladas en el Laboratorio Provincial de Cosméticos de Villa Clara (Cuba). El ensayo se realizó mediante la técnica alternativa *in vitro* en membrana corioalantoidea de embriones de pollo (HET-CAM, hen's egg test chorioallantoic membrane) en sustitución de la técnica habitual de irritabilidad oftálmica en conejos (Draize) y en correspondencia con el Protocolo 47 de INVITOX (In Vitro Toxicology). Los resultados obtenidos permitieron concluir que los índices de irritación (II) obtenidos en todos los casos permiten clasificar a los productos como no irritantes. Ninguno de los cosméticos evaluados mostró ruptura de la membrana biológica, lo cual se verificó por la ausencia de colorante absorbido detectable a 595 nm. Estos resultados permiten avalar la seguridad de estos productos cosméticos para ser usados por la población.<sup>8</sup>

Murillo, Pérez, Tur E *et al.* E (2003) *su investigación* Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la

evaluación de la irritación ocular tuvo como objetivo comparar la utilidad de tres protocolos diferentes de la prueba de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, descrita en una base de datos establecida de técnicas de Toxicología *in vitro*, evaluando la irritación potencial de diez sustancias químicas y formulaciones. Los métodos utilizados en la investigación fueron el Ensayo del HET-CAM según el protocolo No. 47, Ensayo del HET-CAM según el protocolo No. 96 y el Ensayo del CAM-TBS (*Chorioallantoic membrane-Trypan blue system*) según el Protocolo No. 108. Se compararon los datos con aquellos obtenidos en la prueba animal tradicional, obteniendo como resultados y conclusiones lo siguiente: con la técnica descrita en el protocolo No 47 se obtiene una adecuada Clasificación de las sustancias y una adecuada correlación *in vivo/ in vitro*, por lo que es una prueba factible de realizar en cualquier laboratorio. El protocolo No.96 ofrece una técnica con menor sensibilidad y predictibilidad, lo que conlleva a errores en la clasificación de las sustancias en comparación con los datos *in vivo*. La técnica más idónea resultó ser la descrita en el protocolo No.108 de INVITTOX, ya que permite evaluar los resultados de una forma objetiva, se realiza fácil y rápidamente, clasifica adecuadamente las sustancias y tiene una buena sensibilidad, especificidad y predictibilidad, sobre todo cuando se evalúan sustancias de naturaleza química similar. Por su sencillez y confiabilidad, el test es recomendable como un ensayo alternativo en la evaluación toxicológica de la irritación ocular.<sup>9</sup>

García (2007), en su investigación titulada: Evaluación toxicológica a los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophoru*, L; empleando dos técnicas alternativas, tuvo como objetivo desarrollar estudios de toxicología alternativos a *Parthenium hysterophorus*, L. (escoba amarga). Para ello fueron desarrollados dos ensayos alternativos, la toxicidad aguda oral por el método de las clases (T.C.A), para el cual fueron usadas ratas Sprague Dawley administrando dosis únicas de (50 mg/Kg, 300 mg/Kg, 2000 mg/Kg.p.v.) de la suspensión acuosa de los sólidos pulverulentos de la planta por vía oral. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, la T.C.A oral mostró una dosis letal 50 (LD50) superior a 2000 mg/Kg, clasificándose la muestra de ensayo como no tóxica. Así mismo, se evaluó el grado de irritabilidad ocular del extracto obtenido a partir de los sólidos pulverulentos de *Parthenium hysterophorus*, L, mediante

el ensayo de hemólisis con células rojas humanas (RBC), en un rango de cinco concentraciones que abarcaron desde 0.3833 mg/mL hasta 1 mg/mL, a diferentes tiempos de exposición. La prueba de RBC con eritrocitos humanos a los diferentes tiempos de exposición permitió clasificar al extracto vegetal como muy irritante ocular.<sup>10</sup>

Martínez (2007), en su investigación titulada: Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido, tuvo como objetivo principal estudiar el potencial efecto irritante ocular y dérmico de una serie de tensioactivos derivados de aminoácidos utilizando distintos métodos alternativos a la experimentación animal basadas en modelos celulares y organotípicos. Los métodos utilizados en la investigación fueron: el ensayo de hemólisis, ensayos basados en la membrana corioalantoidea: HET-CAM y CAMS-TBS, ensayo de irritación ocular de Draize, ensayos de citotoxicidad en líneas celulares, liberación y producción de la citosina proinflamatoria IL-1 $\alpha$  en la línea celular NCTC 2544, acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas. En cuanto a los resultados y conclusiones obtenidas la resaltante a los métodos en el uso de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina resultan modelos excesivamente sensibles a los tensioactivos y puede sobreestimar su potencial irritante por lo que se descarta su uso para evaluar estos compuestos.<sup>11</sup>

### **2.1.2. Antecedentes Nacionales**

Taype, E. (2015) en su investigación “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”, se planteó como objetivo el estandarizar y validar el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cinco extractos de frutos nativos del Perú. Los frutos evaluados fueron *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano). Estas frutas señaladas son habitualmente usadas en formulaciones cosméticas de las cuales se elaboraron extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos para su evaluación. Para la validación del método

HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) se evaluaron los parámetros: Linealidad, precisión, exactitud y robustez. De acuerdo a ello se obtuvieron conclusiones Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que el método HET-CAM cuantitativo (CAMTBS) propuesto para la medición de la irritabilidad ocular *in vitro* es lineal, exacto y preciso, pero no robusto.<sup>12</sup>

Churampi y Montes (2015) es su investigación titulada: Evaluación de la actividad Antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (kunth) l.h.bailey “tumbo serrano” y su uso como activo biológico en industria cosmética, tuvo como objetivos: demostrar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” mediante la técnica del edema auricular inducido por TPA y la seguridad de uso del extracto etanólico del fruto de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” como activo biológico en la industria cosmética por el método Irritection Assay System (potencial de irritación dérmica) y el método HET CAM (potencial de irritación ocular). Se obtuvieron como resultados que el extracto etanólico al 20% de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentaron actividad antiinflamatoria en las dosis de 500 y 1000 µg y que en las pruebas de seguridad *in vitro*, se observó ligero potencial irritante. Así mismo se concluyó que en las condiciones experimentales se demostró que el extracto etanólico de *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H.Bailey “tumbo serrano” presentó actividad antiinflamatoria y seguridad como activo biológico en la industria cosmética.<sup>13</sup>

Camones, MA Et al. (Perú, 2013) en su estudio “Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de Camú Camú, mediante el método Het Cam” Evaluaron el efecto irritante de formulaciones cosméticas con extractos de Camú Camú. Para la cual metodológicamente usaron formulaciones cosméticas de extractos de Camú Camú, proporcionadas por el laboratorio de AYRU COSMETIC; los investigadores usaron la técnica alternativa in vitro en membrana corioalantoidea en huevos fértiles de gallina (Het Cam, hens eje chorioalantoic menbrane). La activación de la técnica se realizó en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacológica del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la USMP. Arrojo

como conclusiones que ninguno de los cosméticos con extractos de Camú Camú, produjo ruptura de la membrana corioalantoidea, evidenciado por ausencia del colorante absorbido, azul de tripan, detectable a 595 nm.<sup>14</sup>

Ruiz y Ushiñahua (2013). En su investigación Evaluación del potencial irritante de la crema cosmetica "baba de caracol & concha de nacar" comercializada en el mercado de belén en *Oryctolagus cuniculus* cepa New Zealand - Iquitos 2012, tuvieron como objetivo evaluar el potencial irritante de la crema cosmética "Baba de caracol y concha de nácar", comercializado en el mercado de Belén mediante la escala del Test de Draize en conejos albinos con un peso no menor de 2 Kg de sexo macho. La crema cosmética en ensayo se administró por un lapso de 72 horas sobre la piel de los conejos albinos; para lo cual se establecieron un grupo control positivo de Formaldehído al 98%, un control negativo de vaselina USP y un grupo tratado (tres conejos). Durante la evaluación se clasificaron y analizaron las diferentes lesiones dérmicas mediante el uso de la escala del Test de Draize durante las 1, 24, 48 y 72 horas. Al final del estudio se realizó la eutanasia de todos los animales de la investigación mediante decapitación. Según los resultados obtenidos a nivel macroscópico la crema cosmética "Baba de caracol y concha de nácar", no presentó potencial irritante al obtenerse un índice de irritación primaria de 0.23 considerándose este resultado como insignificante, y por ende se encuentra dentro de los límites permitidos para este tipo de estudio. A nivel microscópico la histopatología reveló en todos los conejos tratados con la crema cosmética una leve hiperqueratosis.<sup>15</sup>

Inocente, Toscano y Castañeda (2013). En su investigación: Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método HET-CAM, tuvo como objetivo evaluar el efecto irritante de formulaciones cosméticas con extractos de camu camu. El estudio se realizó con formulaciones cosméticas de extractos de camu camu, proporcionadas por el laboratorio de AYTU COSMETIC; se utilizó la técnica alternativa *in vitro*, en membrana corioalantoidea en huevos fértiles de gallina (HEET CAM, hen's egg test chorioallantoic membrane). La implementación de la técnica se realizó en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la USMP. Como resultado se obtuvo que ninguno de los cosméticos con extracto de camu camu, produjo

ruptura de la membrana corioalantoidea, evidenciado por ausencia del colorante absorbido, azul de tripán, detectable a 595 nm. La investigación concluyo en que los índices de irritación (I.I) obtenidos en todas las formulaciones cosméticas permiten clasificarlas como no irritantes, y constituyen el soporte de la inocuidad, de las mismas, para continuar con pruebas de eficacia clínica.<sup>6</sup>

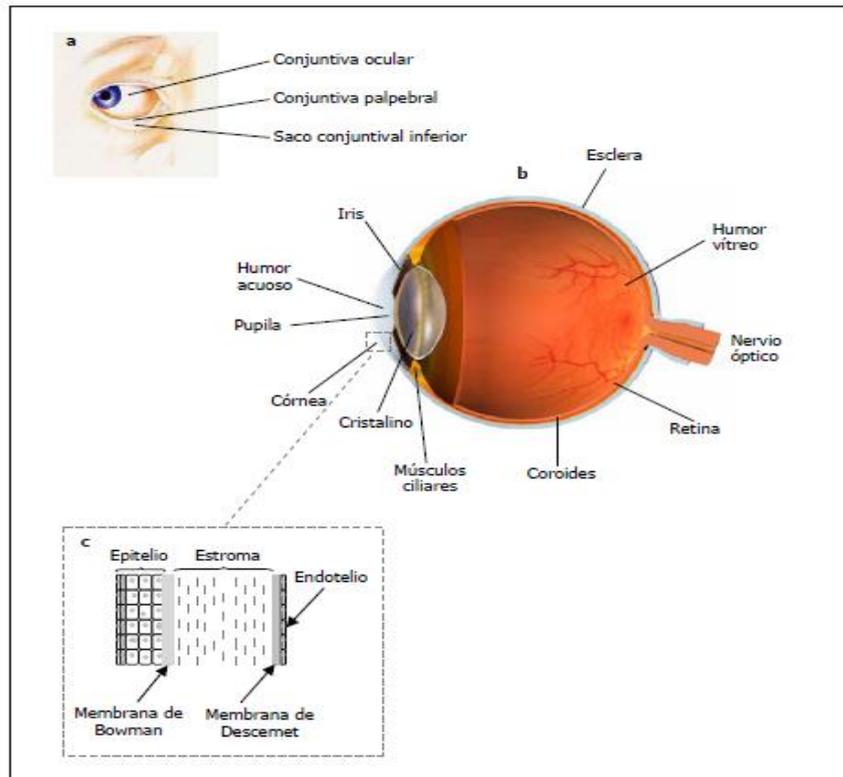
## **2.2. BASES TEORICAS**

### **2.2.1. Anatomía del ojo Humano**

El hombre tiene conocimiento del mundo físico que le rodea mediante los órganos de los sentidos; dentro de ellos, el ojo ocupa un lugar preponderante por su capacidad de capturar la energía visible y convertirla en neuroseñales que se transmiten a través del nervio óptico hacia el cerebro donde se produce la visión.<sup>1</sup>

El ojo se encuentra constantemente expuesto al ambiente, por lo que resulta vulnerable al ataque de cualquier agente físico o químico que pudiera ocasionar alteraciones, daño o pérdida de la visión en dependencia del grado de severidad que cause. Por tales motivos resulta esencial estimar lo más rigurosamente posible el potencial irritante de cualquier compuesto que pueda tener contacto con el ojo y sus estructuras adyacentes.<sup>2</sup>

El ojo puede ser dividido funcionalmente en foto receptores (retina) que son los encargados de conectar los ojos con el sistema nervioso central a través de los nervios ópticos; en estructuras ópticas (córnea, iris, humor acuoso, lente, el cuerpo ciliar y el cuerpo vítreo) cuya función se basa en concentrar la luz visible sobre la retina y en estructuras protectoras, lubricantes y nutricionales. Todas estas funciones oculares se encuentran en un balance delicado, y cualquier lesión traumática, química o física puede afectarlas, creando un desorden de la visión y en dependencia de su alcance hasta pérdida parcial o total de esta.<sup>16</sup>



**Figura 1** Esquema de la anatomía del ojo. En la parte superior (a) se muestra la localización de la conjuntiva que descubre la parte externa del globo ocular y la cara interna de los párpados. También se muestran todas las estructuras que forman el globo ocular (b) y la organización histológica de la córnea (c).

### 2.2.2. Membrana corioalantoidea (CAM)

La CAM del huevo de la gallina es una estructura muy vascularizada, utilizada por el embrión de pollo para el intercambio gaseoso a través de la cámara del huevo. Sus características estructurales la hacen similar a tejidos altamente vascularizados como la conjuntiva y es capaz de responder frente a productos irritantes.

### 2.2.3. Irritación Ocular: Mecanismos Implicados

La irritación del ojo inducida por sustancias químicas involucra la exposición directa de órganos como la córnea, el iris y la conjuntiva. Los efectos sobre estas estructuras pueden ser detectados fácilmente mediante la observación conjunta. Los eventos asociados con el daño ocular se clasifican teniendo en cuenta los criterios de irritación y corrosión.<sup>27</sup>

- La irritación ocular es un cambio inflamatorio reversible que ocurre en la superficie anterior del ojo, seguido de la exposición directa a un material y persiste durante 24 h.
- La corrosión se considera un daño irreversible del tejido ocular debido a la exposición de un material que provoca destrucción de los tejidos gruesos del ojo.
- Los irritantes oculares producen simultáneamente cambios en múltiples tejidos oculares del segmento anterior del ojo. La severidad del daño en cada uno se relaciona con la fortaleza del irritante y la recuperación depende del grado y la extensión del daño a nivel de la propia célula.<sup>27</sup>

El grado de daño causado por un agente externo en la mucosa ocular depende del pH, la capacidad de unión a proteínas epiteliales y de la penetración de este en la córnea. Cuando un irritante penetra en el ojo se activan los mecanismos protectores de este, la secreción de lágrimas aumenta y los vasos se dilatan en función de eliminar o reducir la presencia de tal compuesto. Si la irritación es severa la dilatación de los vasos aumenta y el fluido vascular y las proteínas filtran hacia la conjuntiva causando edema y como consecuencia se afecta el funcionamiento de los párpados. Las lesiones directas a nivel del iris se caracterizan por un incremento de la vascularidad, engrosamiento del estroma, disminución de la reacción a la luz, inflamación acuosa y/o destrucción del grosor del tejido.<sup>29</sup>

### **2.3. Uso de cremas cosméticas para contorno de ojos**

#### **2.3.1. El Contorno de los ojos y la Importancia de las Cremas cosméticas a utilizar**

Extremadamente fina y vulnerable: estas son las dos principales señas de identidad de la zona del contorno de ojos. Y es que la piel de esta área del rostro es distinta a la de las mejillas o la que rodea la boca, por ejemplo. Su espesor medio es de entre 300 y 800 micras; es cinco veces más fina que la del resto de la cara y diez veces más que la del cuerpo. Más datos: su epidermis tiene menos capas de células en la capa córnea (responsable del efecto barrera de la piel frente a las agresiones medioambientales) y el

espesor de su dermis es mucho menor y tiene menos fibras de colágeno y elastina. Y, además, el número de glándulas sebáceas es también inferior, por lo que se reseca con más facilidad.<sup>17</sup>

La importancia del uso de cremas cosméticas para el contorno de ojos básicamente sería por las siguientes razones:

- Es la parte más fina y sensible del rostro. (es 10 veces más fina que el resto).
- Presenta más movimiento por el parpadeo natural que es de 10 mil veces al día, lo que facilita que se arrugue más.
- En esta zona de la cara la piel no tiene glándulas sebáceas lo que motiva su sequedad.
- Las cremas para el contorno de ojos tienen una formulación especial que mejora su aspecto considerablemente.

#### **2.4. Análisis comparativo de productos cosméticos con registro sanitario y productos sin registro sanitario**

Es conocido que la utilización de cosméticos se remonta desde la cultura egipcia hasta la actualidad, la que ha venido evolucionando a través del tiempo, debido al desarrollo en los conocimientos científicos, tecnológicos y toxicológicos que permiten determinar la identidad, la calidad e inocuidad de estos. Producto de esta situación surgen dispositivos que controlan la calidad e inocuidad de insumos y procesos que se dan en la fabricación de los cosméticos. Todo ello con la finalidad de defender al consumidor de sustancias tóxicas o nocivas para su salud.

Un producto cosmético. Es toda sustancia o fórmula de aplicación local a ser usada en las diversas superficies externas del cuerpo humano y sus anexos, incluyendo mucosa bucal y dientes, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, mejorar su aspecto y protegerlos o mantenerlos. Los productos de higiene personal se consideran cosméticos.<sup>16</sup>

De acuerdo a la definición adoptada por la Comunidad Andina de Naciones (CAN).” los productos cosméticos y de higiene personal son todas aquellas sustancias de aplicación local que se usan en diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios, etc.) para perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos y mantenerlos en buen estado”.<sup>19</sup>

Para aprobar y considerar un producto como apto para el uso o consumo humano, se requiere la comprobación de las características físicas, químicas, biológicas, toxicológicas, etc. Así como la ejecución de análisis de laboratorio, la correspondencia con las normas sanitarias y la presentación de certificados sanitarios de las autoridades competentes. Todo este proceso se denomina registro. La evaluación sanitaria de cosméticos se aplica tanto a los productos elaborados nacionalmente como a los importados.<sup>20</sup>

Según la clasificación del Comité Peruano de Cosmética e Higiene de la Cámara de Comercio de Lima (CCL), referente a los productos cosméticos y de higiene personal, las cremas cosméticas para contorno de ojo estarían dentro del rubro de maquillaje.

Entre las cremas con registro sanitario que tienen un sólido posicionamiento en el mercado tenemos reconocidas marcas mundiales como Unique, Ebel, y nacionales como Esika y Cyzone que se concentran en los sectores. Socioeconómicos A, B y C.

Cabe destacar la proliferación de las cremas sin registro sanitario, las cuales en su gran mayoría son adulteradas o bambas, las cuales se venden en mercadillos, galerías, ferias o puestos ambulatorios. A través de la prensa nos enteramos de las incautaciones de estos productos, caso ilustrativo es la incautación de más de una tonelada de cosméticos adulterados en galería del jirón Paruro, por la Digemid en el 2016.<sup>21</sup>

## **2.5. Consecuencias de la toxicidad de las cremas**

Se denomina tóxico a cualquier sustancia que al entrar en contacto con el organismo produce, a través de una acción química, un efecto perjudicial. Este amplio concepto está íntimamente unido a la dosis, de modo que prácticamente todas las sustancias

pueden ser tóxicos a una dosis determinada e inocua a otra dosis. Los signos y síntomas resultantes de la acción de un tóxico constituyen una intoxicación.<sup>22</sup>

Se Menciona que algunas organizaciones como la OMS (Organización Mundial de la Salud) unen esfuerzos con la comunidad científica para darnos mayor transparencia con respecto a los ingredientes o aditivos usados en nuestros cosméticos. Por estudios realizados, se concluyó que hay que evitar: a) Ingredientes o aditivos cosméticos cancerígenos, que son algunos conservantes, colorantes, el talco, perfumes sintéticos y algunos ingredientes de tintes para cabello, b) Algunos químicos que pueden provocar alergias como algunos conservantes, o derivados del petróleo como aditivos químicos.<sup>23</sup>

Incluso Werner experta en cosmética química ha señalado que: “La mitad de los ingredientes analizados que se encuentran en productos cosméticos son considerados tóxicos por la OMS y la FDA, y algunos están relacionados con enfermedades como el cáncer, la dermatitis o el asma. Existen hasta 12,000 ingredientes en los productos cosméticos, de los cuales solamente se han analizado 2.400, la mitad de estos clasificados como tóxicos y que pueden afectar a nuestra salud, teniendo en cuenta que utilizamos una media de 17 productos cada día”.<sup>24</sup>

La legislación internacional y nacional señala con meridiana claridad que no deben contener sustancias mutagenas o toxicas, pero una simple observación a las etiquetas- incluso de prestigiosas marcas internacionales- demostraría que las leyes no se respetan. Y cada día aumentan los especialistas que consideran que muchos cosméticos son auténticos venenos. El pretexto que no son peligrosos ya que los tóxicos que contienen están en pequeñas cantidades no resiste el menor análisis, en la medida de que muchos de ellos al utilizarse diariamente, la cantidad de sustancias perjudiciales que terminan entrando al organismo es al final elevada.<sup>25</sup>

Los siguientes ingredientes cosméticos se consideran desde “recomendables con restricciones” hasta “no recomendables” para uso en cosméticos:

- Aceites Minerales
- Siliconas

- Derivados de PEG y PPG
- Propylene Glycol
- DEA, MEA, TEA
- Nitrosaminos y agentes nitrosantes
- Parabenos y otros conservantes
- Sodium Laureth Sulfate
- Sodium Lauryl Sulfate
- Derivados del Formaldehído
- Compuestos Orgánicos Halógenos
- Ftalatos (Phtalatos)
- Fragancias sintéticas
- Colorantes
- Filtros rayos U.V. en productos de protección solar
- Varios <sup>25</sup>

Veamos otros compuestos peligrosos para la salud que se utilizan en el contorno de ojos:

- Parabenos: compuesto químico utilizado habitualmente en la industrias cosmética y farmacéutica. Actúan de manera efectiva como conservantes en muchos tipos de fórmulas químicas. Estos compuestos y sus sales son usados principalmente por sus propiedades bactericidas y fungicidas. Pueden ser encontrados en champús, cremas hidratantes, geles para el afeitado, lubricantes íntimos, medicamentos tópicos y parenterales, autobronceadores y dentífricos. Evidencia médica los relaciona con tumores de mama.

Reacciones alérgicas, presentan habitualmente:

- Irritación
- Enrojecimiento de la piel
- Dermatitis de contacto
- Inflamación de la piel
- Dolor de la piel

- Sequedad excesiva de la piel

Se relaciona alergia cruzada de este componente con las personas alérgicas a la aspirina. Otros estudios los relacionan con diferentes tipos de cáncer y alteraciones de los estrógenos en el cuerpo, ya que pueden imitar las hormonas interfiriendo en el sistema endocrino (Disruptor endocrino). Se ha relacionado con el cáncer de mama y en la leche materna. En zonas de aplicación de la piel en la que por algún problema está dañada, se ha de poner especial hincapié a la no utilización de cosméticos que contengan estos productos para evitar al máximo la absorción del mismo.

- Laurilsulfato sódico: compuesto tenso activo iónico, empleado en diversos productos de higiene personal, como pasta de dientes, champú y jabones de baño. Entre los efectos dañinos están retirar aceites y grasas de la piel, y causar irritación en piel y ojos.
- Solventes: Son utilizados en cosméticos y productos de higiene personal de la misma rama de aquellos solventes de pinturas y que forman parte de los líquidos anticongelantes de los coches.
- Es una sustancia derivada del petróleo que incluyen en tintes para la coloración del cabello, cremas de manos, exfoliantes y espumas de afeitar, colonias y otros.
- El Glicol Propílico: puede ocasionar irritación y dermatitis, se ha demostrado su nocividad para los riñones y el hígado.
- El alcohol isopropílico: ocasiona irritación y elimina el manto ácido de la piel, promoviendo el crecimiento bacteriano. Provoca envejecimiento prematuro cutáneo.

- Etilendiamina: causa dermatitis, irritación de ojos y mucosas, visión borrosa y se ha comprobado que se absorbe a través de la piel por lo que puede llegar a tener indeseables efectos sistémicos.
- Hydrogen peróxide: o agua oxigenada. Incluso a las dosis permitidas en cosmética (4%) puede producir quemaduras y daños en la vista si penetra en los ojos.
- Hydroxysuccinimide: Se emplea para eliminar las rojeces (contornos de ojos). Da problemas de alergia.
- El mercurio: es un metal pesado de elevada toxicidad a pesar de lo cual a la industria cosmética le permiten usarlo como conservante en productos de maquillaje y desmaquillare de los ojos siempre que su concentración máxima sea de 0,007%. En la etiqueta se puede encontrar bajo la nomenclatura tiosalicilato de etilmercurio.
- Dietanolamina (DEA, MEA o TEA): Se utilizan para que los productos tengan más espuma o cremosidad. Irritan la piel y ojos, pueden ser tóxicos para el sistema nervioso e inmunitario. En combinación con otros productos utilizados en los mismos cosméticos forman tóxicos cancerígenos.
- Pfenilendiamina: Es un compuesto orgánico derivado de las anilinas. Se usa por su capacidad para dar color y es habitual encontrarlo en máscaras de pestañas, tintes, e incluso en la henna empleada para tatuajes y pelo. Origina muchas dermatitis de contacto y también es cancerígena.

Todos los productos cosméticos deben incorporar en su etiqueta una lista de ingredientes y las instrucciones para usarlos sin peligro para la salud. Por ejemplo, algunas sombras de ojos nacaradas contienen pigmentos perlescentes que pueden ser perjudiciales para los ojos causando orzuelos, irritación e incluso conjuntivitis que podría llegar a ser crónica.<sup>26</sup>

## 2.6. Pruebas utilizadas para la evaluación de la irritabilidad de productos cosméticos

### 2.6.1. Prueba de Irritación Ocular de Draize

El ensayo para la predicción de los efectos irritantes de los cosméticos, medicamentos y sustancias químicas sobre las membranas mucosas y la piel fue desarrollado por los toxicólogos Draize y Spines.<sup>31</sup> Existen dos variantes de la prueba: la prueba de irritación cutánea aguda (o prueba de Draize para piel)<sup>1</sup> y la prueba de irritación ocular aguda (o prueba de Draize para mucosas).

El procedimiento, que se usaba inicialmente para probar cosméticos, consiste en la aplicación de 0,5 mL o 0,5 g de una sustancia de prueba en el ojo o en la o en la piel de un animal consciente e inmovilizado, dejarla durante un periodo de tiempo, y después enjuagarla y tomar nota de sus efectos.<sup>31</sup> Los animales son observados durante un máximo de 14 días en busca de señales de eritema y edema en la prueba para piel; y de enrojecimiento, inflamación, secreción, ulceración, hemorragia, opacidad o ceguera en la prueba ocular. Por lo general, el sujeto de prueba es un conejo albino, aunque otras especies, incluyendo perros pueden ser utilizadas.

Este ensayo permite evaluar los efectos a nivel ocular que aparecen por la exposición aguda de las sustancias a analizar 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.

Los resultados de este ensayo han sido usados durante años para la clasificación de diferentes compuestos y han constituido la base de la Norma N° 405 adoptada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico <sup>33</sup> en el año 1981 y de la norma ISO/DIC-10 993 No.10 adoptada en el año 1992 para la conducción de los ensayos de irritabilidad ocular <sup>33</sup>.

## **2.6.2. Métodos Alternativos para Valorar la Irritación Ocular**

### **2.6.2.1. Métodos Alternativos**

El método alternativo abarca 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.<sup>34</sup>

La opinión pública a nivel mundial y en el Perú, viene exigiendo productos de consumo no tóxicos y por otro lado cuestionan el sacrificio de animales en la experimentación científica. Este requerimiento se viene expresando en la legislación europea (Ocde) y en forma creciente en la legislación peruana e incentiva a los investigadores académicos y de laboratorios a buscar otras alternativas.

Muchos han sido los ensayos *in vitro* descritos en la literatura que se proponen como alternativa al ensayo de irritación ocular y son agrupados sobre la base del punto final medido.<sup>35</sup>

En la actualidad los especialistas vienen laborando en la indagación de métodos alternativos y generando mejoras de aquellos métodos que se han mostrado eficaces para la realización de tamizajes iniciales de los productos. La sostenibilidad de los ensayos alternativos es mucho más amplia que la sustitución del uso de animales, sumando también la necesidad de la reducción y refinación.

Los métodos alternativos para valorar la irritación ocular que se ha propuesto para sustituir a los ensayos de Draize se clasifican en modelos basados en órganos aislados, sistemas de cultivo celular o tisular, métodos basados en propiedades fisicoquímicas e *in vitro* de los productos a evaluar.

### **2.6.2.2. Ensayos de Irritabilidad ocular *in vitro***

Por ser el tipo de ensayo a utilizar en este trabajo se ha considerado analizarlo en forma específica en este punto.

El ensayo de la CAM conocido como HET-CAM es un método propuesto por Lüpke<sup>36</sup>, modificado por Spielmann<sup>37</sup> y por Steiling<sup>38</sup> que posibilita considerar el potencial de irritación ocular in vitro de sustancias y productos terminados. Itagaki<sup>41</sup> incorporó una variante a esta técnica, que es el uso de un colorante y la observación espectrofotométrica de la muestra, suprimiendo así el carácter subjetivo del resultado. A partir del establecimiento de estos protocolos, el método del HET-CAM como sustituto del test de Draize ha sido uno de los más utilizados<sup>40 41</sup>.

El HET-CAM consiste básicamente en poner en contacto la sustancia en estudio con la membrana corioalantoidea (MCA) de embriones de pollo de 10 días de incubación, midiéndose el tiempo de aparición de los efectos observables sobre dicha membrana (hemorragia, lisis vascular y coagulación) durante 5 min. La rapidez en la aparición y la intensidad de los daños son expresión del potencial irritante de la sustancia evaluada.

### **2.6.2.3. Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Método HET-CAM).**

En comparación con otros modelos organotípicos, el método HET-CAM permite la identificación de las reacciones por irritación que parece ser similares a las que ocurren en el ojo usando el Test de Draize. En el sistema del método HETCAM, se determinan tres reacciones: hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea al noveno día de embrionación cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado.<sup>44, 45</sup>

Los huevos de gallina se colocan en una incubadora durante 9 días después de cuyo tiempo los huevos defectuosos se descartan. La cáscara alrededor de la celda de aire se retira y las membranas internas se extraen para revelar la membrana corioalantoidea. Las sustancias de ensayo se añaden a la membrana y se dejan en contacto durante 5 minutos. La membrana se examina para evaluar el daño vascular y se registra el tiempo necesario para que se produzca la lesión. La irritación se obtiene de acuerdo con la gravedad y la velocidad a la que se produce el daño.<sup>44</sup>

Después de colocar la muestra de ensayo directamente sobre la CAM, se lleva a cabo una evaluación de los parámetros mencionados anteriormente durante un periodo de

observación de 5 minutos. El enfoque más ampliamente utilizado es la determinación del tiempo de reacción hasta la aparición de cada uno de los tres puntos finales. Otro método es la determinación del umbral de irritación, que evalúa la concentración del material de ensayo en el que se observan los efectos sobre estos.<sup>45</sup>

#### **2.6.2.4. Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA)**

Fue desarrollado por Leighton y colaboradores en 1985.<sup>45</sup>; y modificado por Bagley y colaboradores en 1989 y 1991.<sup>46</sup> El ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA, The chorioallantoic membrane vascular assay por sus siglas en inglés) evalúa los posibles efectos perjudiciales que las sustancias irritantes oculares potenciales producen en los vasos sanguíneos de la CAM del embrión.

En la preparación de este ensayo se corta una pequeña abertura en la cáscara del huevo cuatro días después de la fertilización y una pequeña cantidad de albúmina se elimina para permitir el crecimiento óptimo de la CAM. La abertura se vuelve a cerrar herméticamente y los huevos se incuban durante 6 días. El tiempo máximo de utilización de la CAM, en este ensayo se ha limitado a 10 días con el fin de cumplir con la legislación en los países de la Unión Europea que prohíbe los experimentos en embriones de pollo, mayores de 10 días.<sup>48 49</sup>. En el décimo día, la sustancia de ensayo se aplica directamente sobre una pequeña área de la CAM. Después de la exposición durante 30 minutos se examinan los cambios vasculares en la CAM, por ejemplo, hemorragia, lisis o la aparición de vasos desprovistos de flujo de sangre (vasos fantasmas).

La concentración de las sustancias en el ensayo que suscitan tales efectos perjudiciales en el 50% de los huevos, se calcula como parámetro toxicológico. Este ensayo proporciona una vasculatura funcional similar a la conjuntiva. Las sustancias activas actuarán sobre las células musculares lisas para dilatar o contraer los vasos capilares. El método CAMVA se utiliza en la industria cosmética principalmente en los EE.UU. (o

contrato de laboratorios) para la detección y evaluación de la seguridad de los cosméticos. El diseño de tejidos humanos in vitro ha suplantado a los ensayos basados en la CAM; para las empresas.

#### **2.6.2.5. Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)**

El método CAM-TBS fue desarrollado por Hagino en 1991 y 1993 <sup>49</sup> según el protocolo N° 108 de las técnicas in vitro en Toxicología (INVITTOX, The In vitro Techniques in Toxicology, por sus siglas en inglés). El método CAM-TBS proporciona una evaluación cuantitativa del grado de daño ocasionados en la membrana corioalantoidea del huevo. El uso del colorante de azul de tripán, y determinación espectrofotométrica para evaluar la proporción del daño en el tejido proporciona una medida más objetiva y cuantitativa de irritación que la obtenida con el método HET-CAM, que se basa en una estimación subjetiva de la lisis, hemorragia y coagulación. <sup>50</sup>

Al observar los investigadores los cambios vasculares inducidos por sustancias irritantes en la CAM como lisis, hemorragia o coagulación, que representan los efectos que se pueden producir en la conjuntiva o a nivel in vitro sugirieron una modificación del método de HET-CAM en el que el daño de la membrana se cuantificaría como la cantidad de tinción de azul de tripán adsorbido sobre ella. Las células muertas (con paredes celulares dañadas) se tiñen por el colorante azul de tripán, debido a la unión con las proteínas citosólicas dentro de estas células. La cantidad del colorante adsorbido se correlaciona con la cantidad de células muertas en la CAM.

Este método fue diseñado para examinar el efecto perjudicial de sustancias por medición de la cantidad adsorbida de azul de tripán sobre la CAM, dañada como el punto final del ensayo. La tinción con azul de tripán, ha sido ampliamente utilizada para la medición de la viabilidad celular, la cual detecta la destrucción y desnaturalización de la membrana de la membrana <sup>51</sup>.

## 2.7. Método HET- CAM-Cualitativo

El método Hens Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM), es un método alternativo clasificado dentro de los organotípicos que utiliza la membrana corioalantoide (CAM) de huevos embrionados de pollo. Es utilizado en la industria para identificar el potencial irritante y/o para cuantificar el índice de irritación de materiales durante la investigación<sup>51 52</sup>. Reemplaza el tradicional método de Drayze que coloca la sustancia en estudio directamente a los ojos de conejos. Además es uno de los métodos alternativos más consecuentes con la Toxicología alternativa, que se nutre de las tres erres (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) planteados por Russel y Burch en 1959.

### 2.7.1. Desarrollo del método

Para el desarrollo del ensayo HET-CAM se necesitan huevos de pollos broiler fecundados con un peso entre 50-60 g. Estos se introducen en una cámara climática a  $38,0 \pm 0,5^{\circ}$  C y 70% de humedad relativa (Ineltec, modelo CC SR 0150, Barcelona) y al noveno día de la incubación se realiza la apertura del huevo cortando la cáscara hacia el lado donde está situada la cámara de aire. Posteriormente se retira la membrana interior dejando al descubierto la CAM y se depositan 300 microlitros de la sustancia a testar en cada uno de los huevos. (Control positivo NaOH 0,1N, Control negativo NaCl 0,9% y la sustancia a testar<sup>54- 55</sup>

A continuación, se observa el comportamiento de los vasos sanguíneos durante un tiempo de contacto de 300 segundos, determinando el tiempo de aparición de cada uno de los tres puntos finales (hemorragia: sangrado de los vasos, lisis: desintegración de los vasos y coagulación: desnaturalización de las proteínas intra y extracelulares). En función de los tiempos medidos se calcula el Índice de Irritación (IS, irritation score) mediante la ecuación siguiente:  $IS = [(301 - \text{tiempo de hemorragia}) / 300] \times 5 + [(301 - \text{tiempo de lisis}) / 300] \times 7 + [(301 - \text{tiempo de coagulación}) / 300] \times 9$ <sup>55</sup>.

Si en el IS, se alcanzan puntuaciones entre 0 y 0,9 se considera la sustancia como no irritante, entre 1 y 4,9 como ligeramente irritante, entre 5 y 9,9 moderadamente irritante y de 10 a 21 como severamente irritante. Para cada una de las sustancias se ha utilizado un huevo diferente, realizando cada uno de los ensayos de manera independiente y por triplicado. El cálculo se realiza como la media de la suma de las puntuaciones individuales de todos los puntos finales en cada uno de los replicados<sup>57</sup>.

La prueba se puede aplicar a muestras líquidas diluidas o sin diluir, sustancias sólidas, partículas o sustancias pastosas. Volumen/cantidad de muestra: Para líquidos o productos cremosos estériles 25 mL; para productos sólidos estériles en polvo 25 g; para productos sólidos estériles (en piezas pequeñas) 25 unidades.<sup>56</sup>

### **2.7.2. Validación del Método HET-CAM**

El HET-CAM es una técnica validada por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia), que la ofrece como sustitutiva de la clásica prueba de Draize para determinar irritación ocular<sup>60</sup>. Actualmente ha sido aprobada por las entidades regulatorias en varios países, pues ha demostrado una alta capacidad predictiva en comparación con otros métodos *in vitro*<sup>59</sup>.

Estos incluyen los estudios de colaboración llevadas a cabo por las empresas de cosméticos<sup>62 63</sup> y los que están dentro del Programa CTFA en Estados Unidos<sup>64-66</sup>. Dentro de Europa, se llevaron a cabo estudios de validación independientes por COLIPA<sup>67 68</sup>. Además, el método HET-CAM se incluyó en el estudio de validación CE/HO en todo el mundo<sup>70</sup>.

### **2.7.3. Las 3 reacciones a determinar en la membrana coriolantoidea**

#### **2.7.3.1. Coagulación**

Se denomina como tal al proceso por el cual la sangre pierde liquidez convirtiéndose en un gel para formar un coágulo. Este proceso potencialmente desemboca en las hemostasias, es decir, en el cese de la pérdida de sangre desde un vaso dañado,

seguida por su reparación. El mecanismo de coagulación involucra la activación, adhesión y agregación plaquetaria, junto con el depósito y maduración de la fibrina.

### **2.7.3.2. Lisis**

Destrucción de una célula, normalmente por rotura de la membrana celular mediante un agente específico o un proceso físico. Ejemplo, detergentes fuertes u ondas sonoras de alta energía o por infección con una cepa de un virus que puede lisar las células.

Las células son unidades básicas estructurales y funcionales del cuerpo humano. Ellas contienen diferentes partes, llamadas orgánulos, que contribuyen a la capacidad de ésta para funcionar. La energía es proporcionada por las mitocondrias, las proteínas son sintetizadas en los ribosomas, el ADN está contenido en el núcleo y así sucesivamente. Si un científico está interesado en estudiar un componente particular de uno de estos orgánulos, es necesario romper la celda o hacer una lisis, para aislar los orgánulos de interés del resto de la célula<sup>70</sup>.

Lisis de Bacterias: Todas las células tienen una membrana hecha de fosfolípidos con proteínas embebidas. Las bacterias tienen además una pared celular externa. Los antibióticos del grupo de las penicilinas alteran o inhiben la síntesis de proteínas de la pared celular de las bacterias, causando su destrucción o lisis<sup>70</sup>.

### **2.7.3.3. Hemorragia**

Son desórdenes de la coagulación, son estados de enfermedad que pueden provocar hemorragias espontáneas, formación de hematomas o coagulación obstructiva (trombosis).

### **2.7.4. Ventajas y Desventajas de los Ensayos CAM**

El método HET-CAM ya se utiliza en la industria genética para identificar el potencial irritante o sustancias ligeramente irritantes como los surfactantes durante las evaluaciones de seguridad de las formulaciones y/o materias primas. No se utiliza comúnmente para las evaluaciones de riesgo en el sentido de etiquetado y clasificación,

ya que aún no ha sido reconocida como una alternativa aceptada para el ensayo in vivo de Draize<sup>71</sup>.

La mayoría de los estudios de validación realizados, mostraron una correlación útil entre el método HET-CAM y el Test de Draize para la evaluación de las materias primas, sustancias y productos cosméticos. Esta correlación in vivo frente a in vitro reveló resultados similares en el área de las sustancias de ensayo, así como para tensoactivos y formulaciones a base de tensoactivos<sup>72-74</sup>.

Aunque el HET-CAM se considera que es un método establecido y fiable para propósitos de tamizaje, una limitación potencial se puede ver en la ausencia de la posibilidad de evaluar la reversibilidad y/o irreversibilidad de los efectos. La gravedad de los efectos será evaluada por el método HET-CAM, mientras que por razones metodológicas de la recuperación o la persistencia de los efectos está fuera del alcance de los diversos protocolos del método HET-CAM utilizados en la actualidad. Por esa razón, el futuro papel del método HET-CAM puede limitarse a ser sólo un elemento de una batería de las pruebas de irritación ocular<sup>75</sup>.

Este ensayo presenta varias ventajas, incluyendo su sencillez, rapidez, sensibilidad, facilidad de funcionamiento y su bajo costo relativo. La principal desventaja del procedimiento es la naturaleza subjetiva de la evaluación de los resultados. Esto se supera en cierta medida por la inclusión de estándares positivos y mediante el uso de un esquema integral para eliminar los efectos irritantes de los productos químicos<sup>76</sup>.

## III PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Métodos: Método HET CAM

El método utilizado para la investigación es el método del HET-CAM, el cual permite el estudio de efectos inmediatos que se producen tras el contacto de la sustancia de ensayo con la membrana corioalantoidea de huevos de gallina Leghorn de 10 días de incubación. La mayoría de estos efectos se deben a modificaciones vasculares, aunque también se aprecian interacciones con proteínas. El principio de la técnica incluye el examen macroscópico de los cambios que ocurren en la membrana corioalantoidea (CAM) como hemorragia, vasoconstricción y coagulación.

Por otra parte, el empleo del colorante azul de tripán en este modelo tiene gran utilidad, por su capacidad de penetrar a través de las membranas lesionadas detectando la destrucción y desnaturalización de estas, permitiendo evaluar la viabilidad celular.<sup>80</sup>

#### 3.1.1. Tipo de estudio

Estudio experimental, in vitro, cualitativo y cuantitativo

#### 3.1.2. Materiales y métodos

##### 3.1.2.1 Equipos

- Ovoscopio
- Balanza SARTORIUS BL 50
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Incubadora

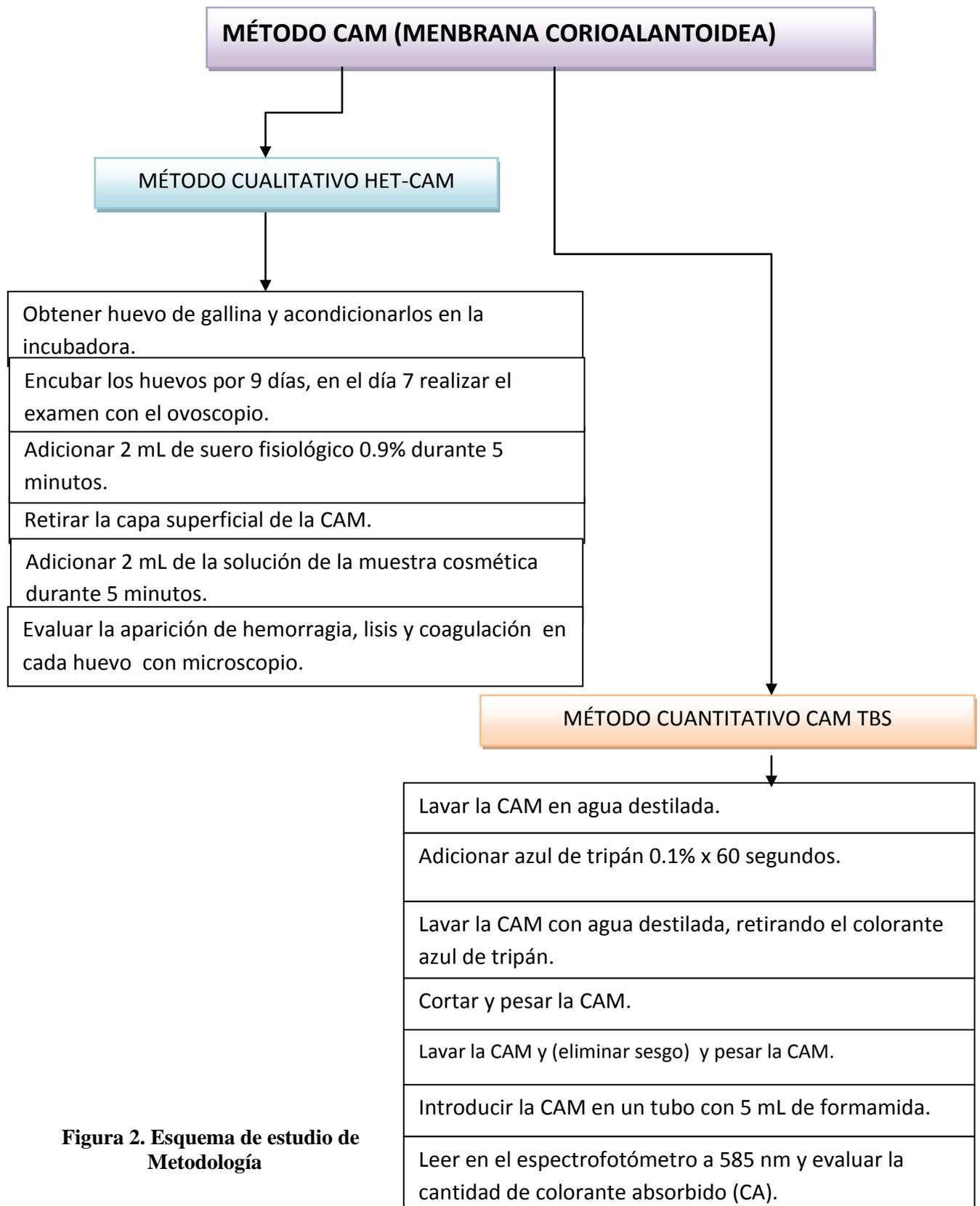
### 3.1.2.2. Materiales

- Probetas de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL (Pírex)
- Beaker de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL (Pírex)
- Baguetas de vidrio
- Porta huevos
- Vaso precipitación 250 mL
- Vaso precipitación de 100mL
- Gotero 1 mL
- Fiolas 50 mL
- Piceta de agua destilada
- Baguetas
- Pipeta 10 mL
- Tubos de ensayo
- Pinzas para tubo de ensayo
- Probeta

### 3.1.2.3 Muestras, reactivos y solventes

- Huevos de gallina fecundados.
- Cremas de diferentes formulaciones cosméticas con y sin registro sanitario
- 06 cremas con registro sanitario
- 06 cremas sin registro sanitario
- Agua destilada
- Azul de tripan
- Lauril sulfato de sodio 1%
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Formamida
- Etanol 96%
- Suero fisiológico
- Propilenglycol

### 3.2. Representación gráfica del estudio



**Figura 2. Esquema de estudio de Metodología**

### 3.3. Obtención de muestras

Las muestras para la presente investigación están constituidas por 60 muestras; 30 cremas con registro sanitario y 30 cremas sin registro sanitario, con 03 repeticiones por cada una.

**Tabla 1.** Muestras de formulaciones para contorno de ojos con y sin registro sanitario.

<b>CREMAS PARA CONTORNO DE OJOS CON Y SIN REGISTRO SANITARIO QUE SE COMERCIALIZAN EN EL DISTRITO DE LA VICTORIA, LA PARADA - LIMA.</b>			
<b>Cremas con registro sanitario (Adquiridas en supermercados y tiendas de la Parada- Lima)</b>		<b>Cremas sin registro sanitario ( Adquiridas en tiendas de la Parada - Lima)</b>	
1	Crema Portugal Contorno de ojos	1	Crema concha de nácar
2	Crema Barbaría Contorno de ojos	2	Crema de sábila
3	Crema Cicatricure Contorno de Ojos	3	Crema de baba de caracol
4	Crema Nívea Contorno de ojos	4	Crema Rosa Mosqueta, baba de caracol y Aloe Vera
5	Crema Contorno de Ojos Ponds	5	Crema de aloe vera y extracto de pepino

Las cremas contorno de ojos fueron adquiridas en el distrito la Victoria - La parada Lima, se visitó los supermercados y tiendas de la parada donde se ubicó las crema con registro sanitario y las que no cuentan con registro sanitario.

### 3.3.1 Cálculo de tamaño de muestra por crema

En la investigación realizada se identificaron 8 cremas para contorno de ojos tanto con registro como sin registro sanitario.

Para calcular el tamaño de la muestra para cada tipo de crema se empleó el muestreo aleatorio simple.

$N$ : es el tamaño de la población o universo (número total de posibles encuestados).

$Z_{\alpha}$ : es una constante que depende del nivel de confianza que asignemos

Los valores de  $Z_{\alpha}$  más utilizados y sus niveles de confianza son:

**Tabla 2. .** Los valores de  $Z_{\alpha}$  más utilizados y sus niveles de confianza

Valor de $Z_{\alpha}$	1.28	1.65	1.69	1.75	1.81	1.88	1.96
Nivel de confianza	80%	90%	91%	92%	93%	94%	95%

Dónde:

$E$ : es el error muestral deseado, en tanto por ciento.

$p$ : proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio. Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que  $p=q=0.5$  que es la opción más segura.

$q$ : proporción de individuos que no poseen esa característica, es decir, es  $1-p$ .

$n$ : tamaño de la muestra (número de encuestas que vamos a hacer).

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 N p q}{e^2 (N - 1) + Z_{\alpha}^2 p q}$$

Datos:

Z =	1,96
N =	8,00
p =	0,95
q =	0,05
e =	0,10

$$= \frac{1.96^2 \times 8 \times 0.95 \times 0.05}{0.10^2 (8 - 1) + 1.96^2 \times 0.95 \times 0.05}$$

$$n = \frac{1.459808}{0.252476}$$

$$n = 5$$

De acuerdo al cálculo realizado la cantidad de muestras que se aplicó en la investigación es de 5 cremas para contorno de ojos con registro sanitario y 5 cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.

### **3.4. Evaluación de la irritabilidad ocular en las cremas para contorno de ojos HET-CAM cualitativo.**

#### **3.4.1. Incubación de los huevos de la gallina**

Los huevos de gallina fecundados fueron encubados en el equipo del laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener (UNW).

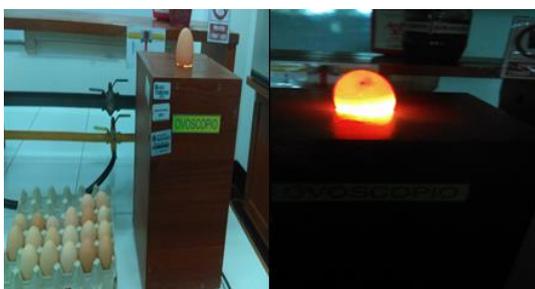
Colocar los huevos sobre las bandejas de la incubadora y someter a una temperatura de 37,5° C y durante 9 días, girarlos durante 7 días para evitar que el embrión se adhiera a un lado del huevo.



**Figura 3. Incubadora utilizada para la conservación de huevos.**

#### **3.4.2. Verificación del crecimiento del embrión**

Se realizó el seguimiento con el Ovoscopio que permite ver la formación del embrión.



**Figura 4. Presencia del embrión.**

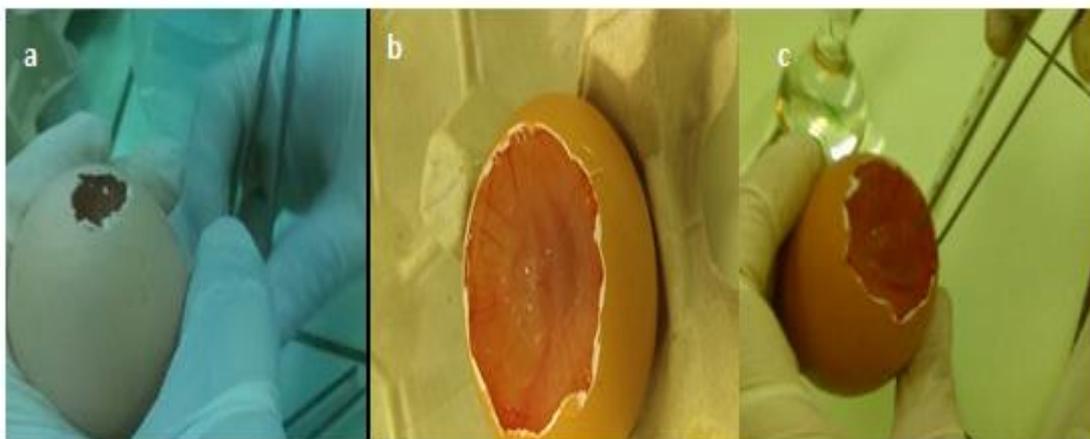
#### **3.4.3. Preparación de la CAM**

Para este ensayo se utilizaron huevos fecundados de gallinas incubados por 9 días. Con ayuda de tijeras y pinzas, se realizó un orificio por la zona de cámara de aire,

dejando expuesta la membrana corioalantoidea (los huevos con la membrana corioalantoidea lesionada no fueron aceptados). Se adiciona 2 mL de suero fisiológico para humedecer la capa blanquecina que cubre la membrana corioalantoidea durante 5 minutos. Luego se retiro con mucho cuidado la capa blanquecina después de humedecerlo con la solución salina.



**Figura 5. Huevos para la preparación de la CAM**



**Figura 6. Preparación de la CAM. En la imagen a) Muestra la preparación de la membrana primero se recorta la cascara de huevo. b) Se retira la primera membrana blanquecina c) Se expondrá la CAM.**

#### 3.4.4. Exposición de la membrana a los controles y formulaciones cosméticas

Se aplicó 0,3 mL de los controles blanco y solventes a la membrana con 03 repeticiones muy aparte se prepararon las soluciones de cada una de las formulaciones cosméticas al 2% (p/v) en solución salina fisiológica y se agregó 0,3 mL a la membrana carioalantoidea ya expuesta, con 03 repeticiones por cada muestra problema, se realizó la observación de la membrana para valorar la posible aparición de los siguientes fenómenos como hemorragia, lisis y coagulación, se anotó el tiempo de aparición en segundos durante un tiempo máximo de observación de 5 min o aproximadamente 300 segundos trascurrido ese tiempo se retiró el exceso del producto lavando con agua destilada.



**Figura 7. Adicionar 0.3 mL de la solución de la solución al 2%.**



**Figura 8. Reposo en la membrana corioalantoidea de la solución de la crema.**

Una vez tomado el tiempo se realiza la siguiente ecuación:

Dónde:

$$I.I. = ((301 - TH) / 300) \times 5 + ((301 - TL) / 300) \times 7 + ((301 - TC) / 300) \times 9$$

- I.I. = Índice de irritación
- TH = Tiempo de aparición de hemorragia
- TL = Tiempo de aparición de lisis
- TC = Tiempo de aparición de coagulación

Una vez obtenido los índices de irritación de las cremas y de los controles positivos, solventes y blanco se compara con la tabla 2 para determinar si el extracto es irritante.

**Tabla 3.** Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante el método HET- CAM

<b>IIO</b>	<b>Clasificación</b>
De 0 a 0,9	No irritante
De 1 a 4,9	Ligeramente irritante
De 5 a 8,9	Irritante
De 9 a 21	Muy irritante

**Fuente:** Lüepke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Food and Chemical Toxicology. 1985 [38]

### 3.5. Método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

Para el método CAM-TBS se guio del (INVITTOX, protocolo N° 108)

Una vez concluida la observación de la membrana corioalantoidea y registrado los signos descritos anteriormente, se procede de la siguiente manera:

La membrana se lava con agua destilada y se depositan 0,5 mL de la solución de azul de tripán al 0,1% en (PBS), dejándola actuar durante 1 min. Después del tiempo, la membrana se lavó con agua destilada, se cortó y se colocó en una capsula petri con

agua destilada para eliminar el exceso del colorante, luego se pesa en una balanza analítica para eliminar el sesgo de la diferencia en el tamaño de cada muestra. Posteriormente se introduce en un tubo de plástico con 3 mL de formamida para arrastrar el colorante fijado del tejido, cuando la formamida extrajo todo el colorante, se descartó la membrana y se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras.

La determinación del potencial irritante de la sustancia de ensayo se realiza según la ecuación:

Dónde:

$$CA = b \times 5/1000 \times 10^9 \text{ nmoles}$$

- CA= Cantidad de colorante absorbido
- b = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón)/mg de membrana

La comparación se realiza entre los embriones tratados con las sustancias de ensayo y los controles positivo y negativo.

Con el dato obtenido se determina la clasificación de irritación,

**Tabla 4.** Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS

CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	CATEGORÍA
≤ 0,100 nmoles/mg	NO IRRITANTE
0,100 – 0,150 nmoles/mg	IRRITANTE MODERADO
≥0,150 nmoles/mg	IRRITANTE SEVERO

**Fuente:** García L.; Gleiby M.; Montes de Oca N.; Hidalgo L. Estudio de irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. *Rev. Toxicol.* 2004. [117]

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Resultados método HET-CAM de indicadores – controles positivos, blanco y solventes

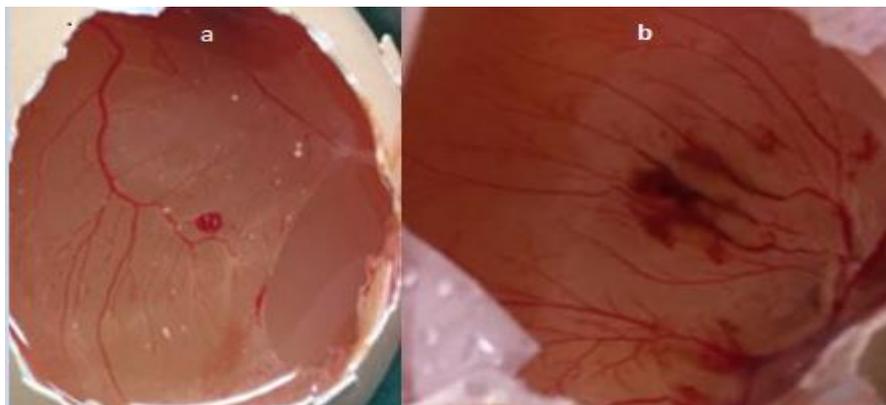


Figura 9. a) Evaluación del efecto del suero fisiológico se observa que no presenta daño alguno, b) Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0.1 N en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia.

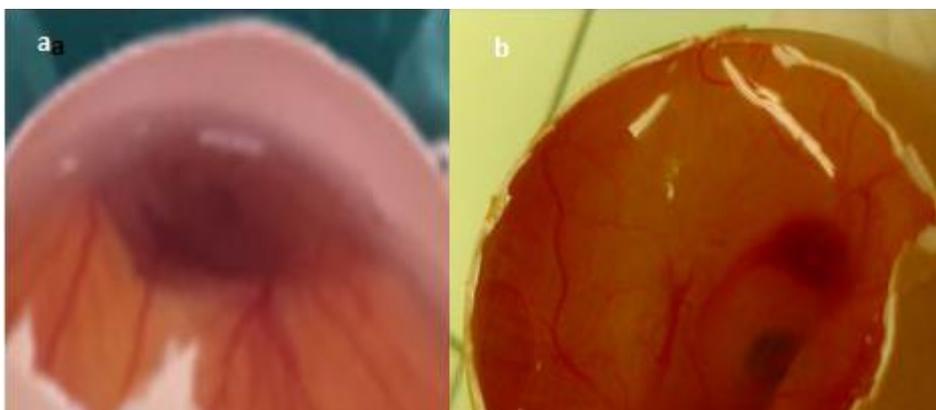


Figura 10. a) Evaluación del efecto del etanol se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia, b) Evaluación del efecto del Lauril sulfato de sodio 1% en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia.

**Tabla 5.** Datos obtenidos de los controles del método HET- CAM – Controles

N°	CONTROL	TIPO DE CONTROL	N° HUEVO	TIEMPO DE REACCIÓN (SEGUNDOS)		
				H*	L*	C*
01	Suero Fisiológico	Blanco	01	301	301	301
			02	301	301	301
			03	301	301	301
02	Lauril Sulfato de sodio	Control Positivo 1	01	301	130	140
			02	301	130	140
			03	301	130	140
03	Hidróxido de sodio	Control Positivo 2	01	128	120	180
			02	128	120	180
			03	128	120	180
04	Etanol	Solvente 1	01	301	210	240
			02	301	210	240
			03	301	210	240
05	Propilenglicol	Solvente 2	01	301	261	275
			02	301	261	275
			03	301	261	275

Donde:

H\*: Hemorragia

L\*: Lisis

C\*: Coagulación

**Tabla 6.** Resultados obtenidos de los controles del método HET- CAM cualitativo– Controles

Nº	CONTROL	ÍNDICE DE IRRITACIÓN	ÍNDICE DE IRRITACIÓN PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
01	Suero Fisiológico	0.00	0.00	No Irritante
		0.00		
		0.00		
02	Lauril Sulfato de sodio	8.82	8.82	Irritante Moderado
		8.82		
		8.82		
03	Hidróxido de sodio	10.73	10.73	Irritante Severo
		10.73		
		10.73		
04	Etanol	3.95	3.95	Irritante Leve
		3.95		
		3.95		
05	Propilenglicol	1.71	1.71	Irritante Leve
		1.71		
		1.71		

#### 4.2. Resultados del HET-CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario

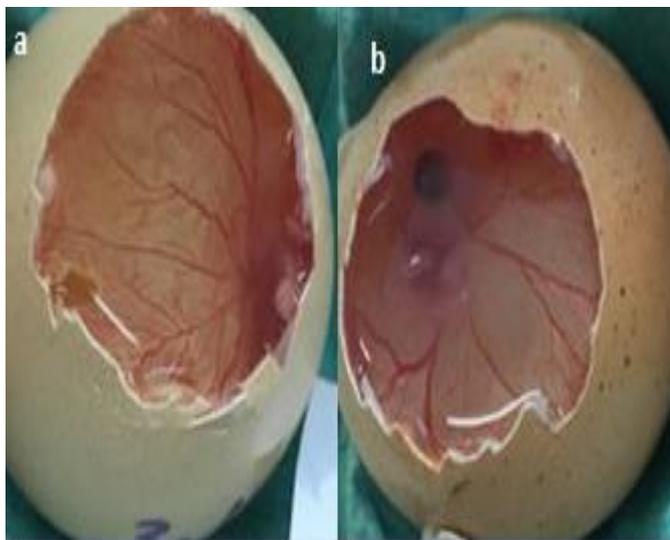


Figura 11. a) Evaluación del efecto de la Crema Portugal Q10 contorno de ojos se observa que presenta lisis, b) Evaluación del efecto de la Crema Cicatricure contorno de ojos en la CAM presenta lisis en poco tiempo.

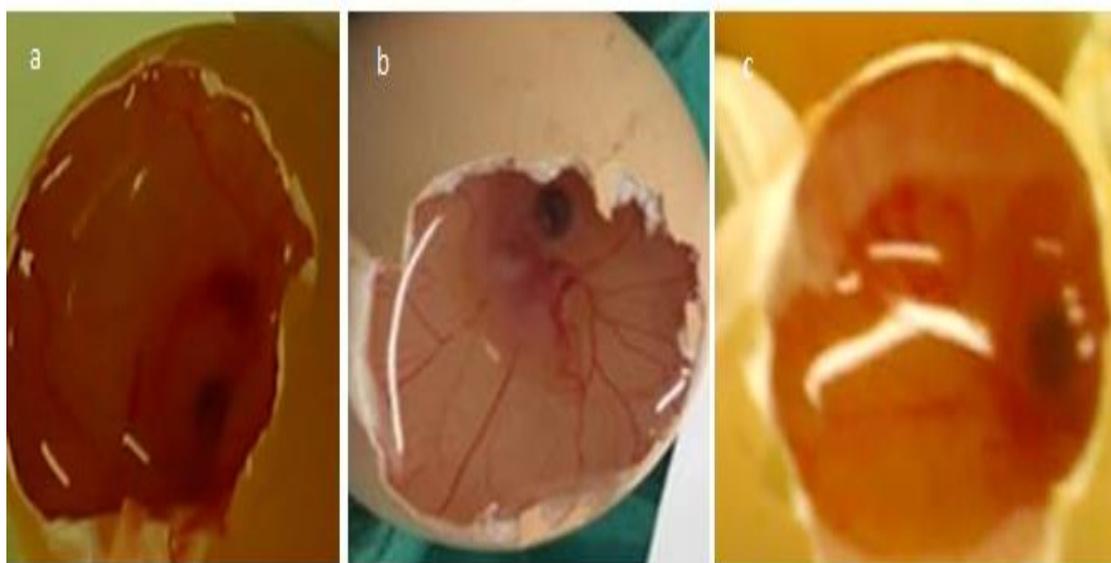
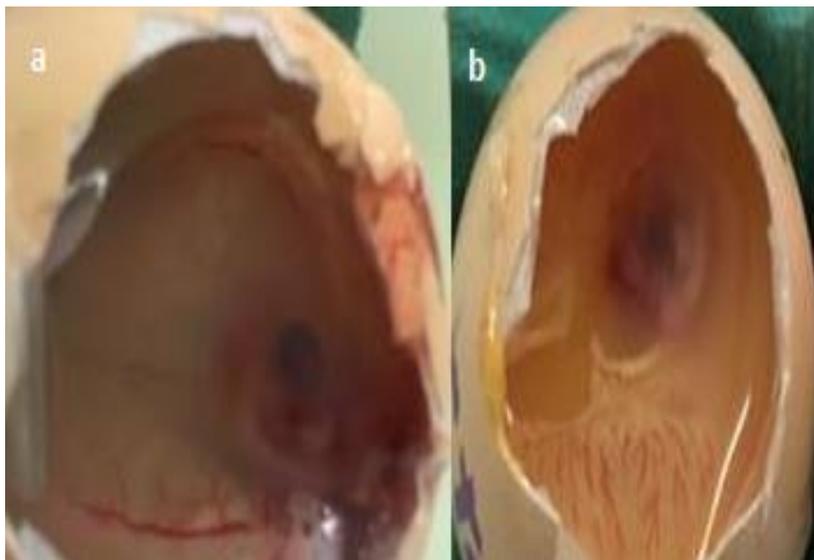
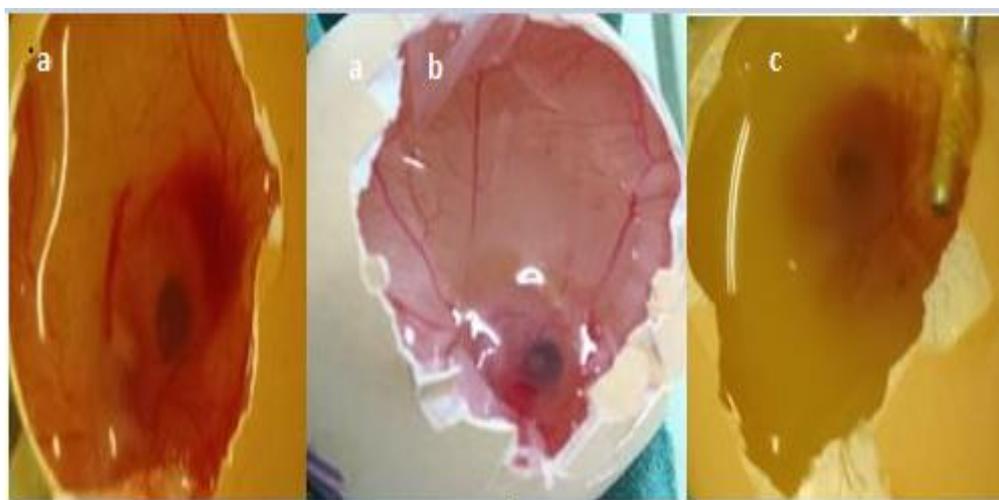


Figura 12. a) Evaluación del efecto de la Crema Barbaria contorno de ojos se observa que presenta lisis. b) Evaluación del efecto de la Crema Nívea Q10 contorno de ojos en la CAM, presenta lisis. c) Evaluación del efecto de la Crema contorno de ojos Ponds se observa que presenta lisis en poco tiempo.



**Figura 13 . a) Evaluación del efecto de la Crema Concha de Nácar se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia. b) Evaluación del efecto de la Crema de Sábila en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia**



**Figura 14. a) Evaluación del efecto de la Crema de Baba de caracol se observa que presenta daño lisis, coagulación y hemorragia, b) Evaluación del efecto de la Crema Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera en la CAM, presenta lisis, coagulación y hemorragia. c) Evaluación del efecto de la Crema de Aloe vera y Extracto de Pepino. Se observa que presenta daño lisis, mayor coagulación y hemorragia**

**Tabla 7.** Resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con registro sanitario

Nº	MUESTRAS CON REGISTRO SANITARIO	Nº DE MUESTRA	ÍNDICE DE IRRITACIÓN	ÍNDICE DE IRRITACIÓN PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
01	Crema Portugal	M1	0.86	0.86	No irritante
			0.89		
			0.84		
		M2	0.82	0.79	No irritante
			0.77		
			0.77		
		M3	0.89	0.82	No irritante
			0.75		
			0.82		
		M4	0.84	0.84	No irritante
			0.86		
			0.82		
		M5	0.79	0.82	No irritante
			0.82		
			0.84		
		M6	0.82	0.84	No irritante
			0.86		
			0.84		
02	Crema Barbaría	M1	1.07	1.03	Ligeramente Irritante
			1.05		
			0.96		
		M2	0.98	1.01	Ligeramente Irritante
			0.96		
			1.10		
		M3	1.12	1.10	Ligeramente Irritante
			1.07		

			1.10				
		M4	1.14	1.10	Ligeramente Irritante		
			1.10				
			1.07				
		M5	1.07	1.06	Ligeramente Irritante		
			1.07				
			1.05				
		M6	1.10	1.07	Ligeramente Irritante		
			1.07				
			1.05				
03	Crema Cicatricure	M1	0.75	0.69	No irritante		
			0.68				
			0.65				
		M2	0.70	0.72	No irritante		
			0.75				
			0.72				
		M3	0.63	0.67	No irritante		
			0.65				
			0.72				
		M4	0.00	0.22	No irritante		
			0.65				
			0.00				
		M5	0.00	0.21	No irritante		
			0.00				
			0.63				
		M6	0.00	0.00	No irritante		
			0.00				
			0.00				
				M1	1.05	1.00	Ligeramente Irritante
					1.00		
					0.98		
		M2	1.07		Ligeramente		

04	Crema Nívea		1.10	1.10	Irritante
			1.12		
		M3	1.03	1.02	Ligeramente Irritante
			1.03		
			1.00		
		M4	0.98	1.00	Ligeramente Irritante
			1.00		
			1.03		
		M5	1.05	1.04	Ligeramente Irritante
			1.00		
			1.07		
		M6	1.03	1.02	Ligeramente Irritante
1.03					
1.00					
05	Crema Ponds	M1	0.98	1.00	Ligeramente Irritante
			1.00		
			1.03		
		M2	1.05	1.04	Ligeramente Irritante
			1.00		
			1.07		
		M3	1.03	1.03	Ligeramente Irritante
			1.03		
			1.03		
		M4	1.07	1.03	Ligeramente Irritante
			1.03		
			1.00		
		M5	1.03	1.04	Ligeramente Irritante
			1.03		
			1.05		
		M6	1.03	1.02	Ligeramente Irritante
			1.00		
			1.03		

**Tabla 8.** Resumen de resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos con registro sanitario

Nº	MUESTRAS CON REGISTRO SANITARIO	ÍNDICE DE IRRITACIÓN PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
01	Crema Portugal	0.83	No irritante
02	Crema Barbaría	1.06	Ligeramente Irritante
03	Crema Cicatricure	0.42	No irritante
04	Crema Nívea	1.03	Ligeramente Irritante
05	Crema Ponds	1.03	Ligeramente Irritante

**Tabla 9.** Resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos sin registro sanitario

Nº	MUESTRA SIN REGISTRO SANITARIO	Nº DE MUESTRA	ÍNDICE DE IRRITACIÓN	ÍNDICE DE IRRITACIÓN PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
01	Crema concha de nácar	M1	6.15	6.17	Irritante
			6.11		
			6.25		
		M2	6.28	6.20	Irritante
			6.18		
			6.13		
		M3	6.18	6.16	Irritante
			6.18		
			6.13		
		M4	6.25	6.22	Irritante
			6.20		
			6.21		
		M5	6.22	6.24	Irritante

		M6	6.26	6.25	Irritante		
			6.25				
			6.25				
			6.25				
			6.25				
02	Crema de Sábila	M1	6.74	6.75	Irritante		
			6.73				
			6.77				
		M2	6.64	6.62	Irritante		
			6.66				
			6.57				
		M3	6.68	6.67	Irritante		
			6.68				
			6.64				
		M4	6.85	6.73	Irritante		
			6.71				
			6.64				
		M5	6.79	6.73	Irritante		
			6.74				
			6.67				
		M6	6.84	6.74	Irritante		
			6.72				
			6.67				
		03	Crema Baba de Caracol	M1	7.22	7.32	Irritante
					7.31		
					7.42		
M2	7.34			7.29	Irritante		
	7.31						
	7.22						
M3	7.31			7.44	Irritante		
	7.53						
	7.47						

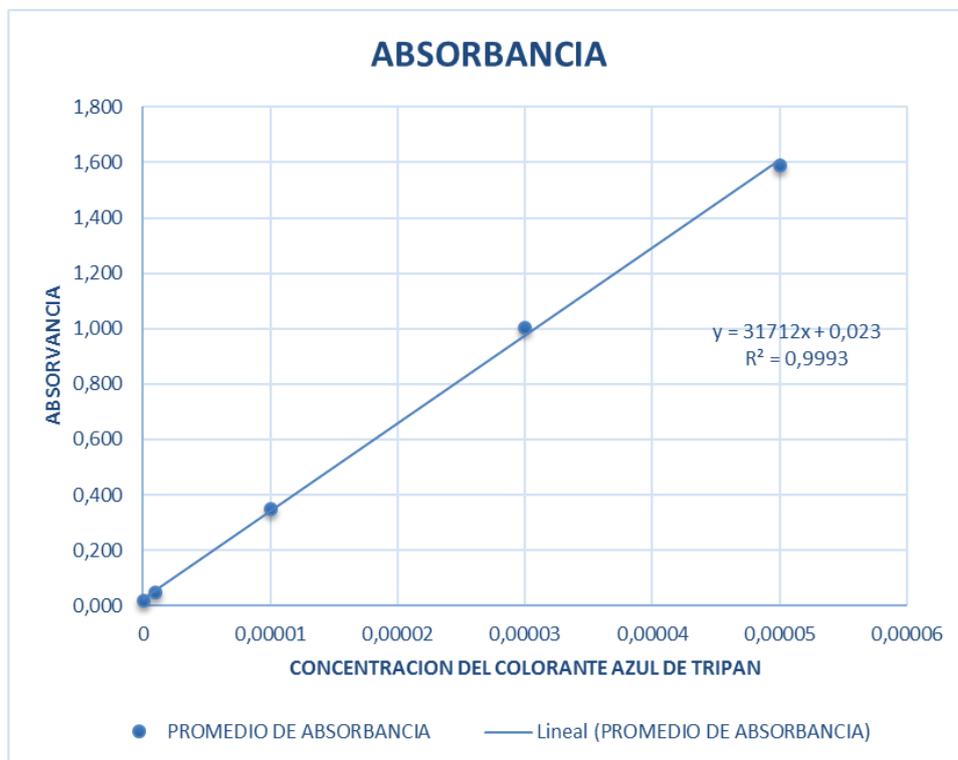
		M4	7.35	7.33	Irritante		
			7.34				
			7.30				
		M5			7.47	7.45	Irritante
					7.50		
					7.38		
		M6			7.42	7.43	Irritante
					7.50		
					7.38		
04	Crema Rosa Mosqueta, baba de caracol y Aloe Vera	M1	6.82	6.85	Irritante		
			6.93				
			6.80				
		M2			7.17	7.06	Irritante
					6.90		
					7.10		
		M3			6.80	6.92	Irritante
					7.02		
					6.94		
		M4			6.80	6.92	Irritante
					7.02		
					6.94		
		M5			6.86	6.72	Irritante
					6.69		
					6.62		
		M6			6.82	6.85	Irritante
					6.93		
					6.80		
		M1	6.80	6.84	Irritante		
			6.93				
			6.80				
		M2			7.06	7.02	Irritante
					6.90		

05	Crema Aloe vera y extracto de pepino		7.10		
		M3	6.78	6.89	Irritante
			6.96		
			6.94		
		M4	6.80	6.89	Irritante
			6.96		
			6.92		
		M5	6.80	6.92	Irritante
			6.99		
			6.96		
		M6	6.80	6.96	Irritante
			7.08		
			6.99		

**Tabla 10.** Resumen de resultados obtenidos del método HET- CAM cualitativo en cremas contorno de ojos sin registro sanitario

Nº	MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	ÍNDICE DE IRRITACIÓN PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
01	Crema concha de nácar	6.21	Irritante
02	Crema de Sábila	6.71	Irritante
03	Crema Baba de Caracol	7.38	Irritante
04	Crema Rosa Mosqueta, baba de caracol y Aloe Vera	6.89	Irritante
05	Crema Aloe vera y extracto de pepino	6.93	Irritante

### 4.3. Método de la CAM mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)



**Gráfico 1.** Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida

**Tabla 11.** Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIAS			PROMEDIO DE ABSORBANCIA
0,00005	1,590	1,591	1,590	1,590
0,00003	1,002	1,001	1,002	1,002
0,00001	0,350	0,351	0,351	0,351
0,000001	0,045	0,046	0,046	0,046
0,0000001	0,015	0,016	0,016	0,016

#### 4.4. Resultados método CAM- TBS de indicadores y controles.

**Tabla 12.** Datos obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio.

CONTROL	TIPO DE CONTROL	PESO MEMBRANA mg	LONGITUD DE ONDA	ABSORBANCIA (nm)
Suero Fisiológico 01	Blanco	261.00 mg	580 nm	0,032
Suero Fisiológico 02	Blanco	260.10 mg	580 nm	0,031
Suero Fisiológico 03	Blanco	260.10 mg	580 nm	0,032
Lauril Sulfato de sodio 01	Control Positivo 1	441.20 mg	580 nm	0,411
Lauril Sulfato de sodio 02	Control Positivo 1	401.40 mg	580 nm	0,356
Lauril Sulfato de sodio 03	Control Positivo 1	412.00 mg	580 nm	0,345
Hidróxido de	Control	354.20 mg	580 nm	0,625

sodio 01	Positivo 2			
Hidróxido de sodio 02	Control Positivo 2	350.10 mg	580 nm	0,524
Hidróxido de sodio 03	Control Positivo 2	352.10 mg	580 nm	0,524
Etanol 01	Solvente 1	340.10 mg	580 nm	0,42
Etanol 02	Solvente 1	450.40 mg	580 nm	0,344
Etanol 03	Solvente 1	440.80 mg	580 nm	0,351
Propilenglicol 01	Solvente 2	362.20 mg	580 nm	0,291
Propilenglicol 02	Solvente 2	372.60 mg	580 nm	0,298
Propilenglicol 03	Solvente 2	372.60 mg	580 nm	0,289

**Tabla 13.** Resultados obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio.

CONTROL	TIPO DE CONTROL	CONCENTRACIÓN COLORANTE Moles/mg	CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Suero Fisiológico 01	Blanco	$1,0874 \times 10^{-9}$	0,0054	No irritante
Suero Fisiológico 02	Blanco	$9,6655 \times 10^{-10}$	0,0048	No irritante
Suero Fisiológico 03	Blanco	$1,0874 \times 10^{-9}$	0,0054	No irritante
Lauril Sulfato de sodio 01	Control Positivo 1	$2,7731 \times 10^{-8}$	0,1387	Irritante Moderado
Lauril Sulfato de sodio 02	Control Positivo 1	$2,616 \times 10^{-8}$	0,1308	Irritante Moderado
Lauril Sulfato de sodio 03	Control Positivo 1	$2,4645 \times 10^{-8}$	0,1232	Irritante Moderado
Hidróxido de sodio 01	Control Positivo 2	$5,3595 \times 10^{-8}$	0,2680	Muy irritante
Hidróxido de sodio 02	Control Positivo 2	$4,5125 \times 10^{-8}$	0,2256	Muy irritante
Hidróxido de sodio 03	Control Positivo 2	$4,4869 \times 10^{-8}$	0,2243	Muy irritante
Etanol 01	Solvente 1	$2,8446 \times 10^{-8}$	0,1422	Irritante Moderado
Etanol 02	Solvente 1	$2,2474 \times 10^{-8}$	0,1124	Irritante Moderado

Etanol 03	Solvente 1	$2,3464 \times 10^{-8}$	0,1173	Irritante Moderado
Propilenglicol 01	Solvente 2	$2,3333 \times 10^{-8}$	0,1167	Irritante Moderado
Propilenglicol 02	Solvente 2	$2,3274 \times 10^{-8}$	0,1164	Irritante Moderado
Propilenglicol 03	Solvente 2	$2,2512 \times 10^{-8}$	0,1126	Irritante Moderado

**Tabla 14.** Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de los controles del estudio.

CONTROL	TIPO DE CONTROL	PROMEDIO CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Suero Fisiológico	Blanco	$0,0052 \pm 0,0003$	No irritante
Lauril Sulfato de sodio	Control Positivo	$0,1309 \pm 0,0078$	Irritante Moderado
Hidróxido de sodio	Control Positivo	$0,2393 \pm 0,0249$	Muy irritante
Etanol	Solvente	$0,1240 \pm 0,0160$	Irritante Moderado
Propilenglicol	Solvente	$0,1152 \pm 0,0023$	Irritante Moderado

#### 4.5. Resultados del (CAM-TBS) cuantitativo en cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario

**Tabla 15.** Resultados Finales obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	PROMEDIO CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Crema concha de nácar	$0,5111 \pm 0.0393$	Muy irritante
Crema de Sábila	$0.3478 \pm 0.0018$	Muy irritante
Crema Baba de Caracol	$0.2975 \pm 0.0059$	Muy irritante
Crema aloe vera	$0.1068 \pm 0.0029$	Irritante Moderado
Crema rosa mosqueta, baba de caracol y aloe vera	$0.1158 \pm 0.0027$	Irritante Moderado

**Tabla 16.** Resultados Finales obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	PROMEDIO CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Crema Portugal	$0.0628 \pm 0.0037$	No irritante
Crema Barbaría	$0.0333 \pm 0.0006$	No irritante
Crema Cicatricure	$0.0843 \pm 0.0033$	No irritante
Crema Nívea	$0.0344 \pm 0.0007$	No irritante
Crema Pond's	$0.0327 \pm 0.0005$	No irritante

**4.6. Comparativa de resultados HET CAM y CAM -TBS de controles y cremas contorno de ojos con y sin registro sanitario.**

**Tabla 17.** Comparativa de resultados HET CAM y CAM-TBS en controles Positivos, blanco y solventes.

<b>COMPARATIVA DE RESULTADOS HET CAM Y CAM-TBS EN CONTROLES POSITIVOS, BLANCO Y SOLVENTES</b>			
<b>Nº</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>HET CAM</b>	<b>CAM- TBS</b>
<b>1</b>	Suero fisiológico	NO IRRITANTE	NO IRRITANTE
<b>2</b>	Lauril sulfato de sodio 1%	IRRITANTE MODERADO	IRRITANTE MODERADO
<b>3</b>	Hidróxido de sodio 0.1N	IRRITANTE SEVERO	MUY IRRITANTE
<b>4</b>	Etanol	IRRITANTE LEVE	IRRITANTE MODERADO
<b>5</b>	Propilenglicol	IRRITANTE LEVE	IRRITANTE MODERADO

**Tabla 18.** Comparativa de resultados HET CAM y CAM-TBS de cremas para contorno de ojos con y sin registro sanitario

<b>COMPARATIVA DE RESULTADOS HET CAM Y CAM-TBS EN CREMAS PARA CONTORNO DE OJOS CON Y SIN REGISTRO SANITARIO</b>							
<b>CREMAS CON REGISTRO SANITARIO</b>				<b>CREMAS SIN REGISTRO SANITARIO</b>			
<b>Nº</b>	<b>Muestra</b>	<b>HET CAM</b>	<b>CAM- TBS</b>	<b>Nº</b>	<b>Muestra</b>	<b>HET CAM</b>	<b>CAM- TBS</b>
<b>1</b>	Crema Portugal Q10 contorno de ojos	NO IRRITANTE	NO IRRITANTE	<b>1</b>	Crema Concha de Nácar	IRRITANTE	MUY IRRITANTE
<b>2</b>	Crema Barbaria contorno de ojos	LIGERAMENTE IRRITANTE	NO IRRITANTE	<b>2</b>	Crema de Sábila	IRRITANTE	MUY IRRITANTE
<b>3</b>	Crema Cicatricure contorno de ojos	NO IRRITANTE	NO IRRITANTE	<b>3</b>	Crema de Baba de caracol	IRRITANTE	MUY IRRITANTE
<b>4</b>	Crema Nívea Q10 contorno de ojos	LIGERAMENTE IRRITANTE	NO IRRITANTE	<b>4</b>	Crema Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera	IRRITANTE	IRRITANTE MODERADO
<b>5</b>	Crema contorno de ojos Ponds	LIGERAMENTE IRRITANTE	NO IRRITANTE	<b>5</b>	Crema de Aloe vera y Extracto de Pepino	IRRITANTE	IRRITANTE MODERADO

## V DISCUSIÓN

- En la presente investigación se tuvo como objetivo principal el determinar el índice de irritabilidad ocular in vitro mediante los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cremas cosméticas (contorno de ojos) con registro sanitario y sin registro sanitario. Este objetivo se logró con éxito obteniendo los resultados tanto por el método cualitativo como cuantitativo, lo cual permitió realizar el análisis respectivo en las cremas cosméticas analizadas.

En el desarrollo del método se empleó como patrones para los análisis, un tensoactivo como el Lauril sulfato de sodio, una base alcalina, que fue el hidróxido de sodio y etanol.

- El objetivo específico de comparar el nivel de irritabilidad ocular entre cremas con registro sanitario y sin registro sanitario se cumplió al 100%, ya que, a la culminación de los procedimientos y análisis de la investigación, basados en el método HET CAM cualitativo, se logró diferenciar claramente los resultados y comparar el nivel de irritabilidad entre cremas con registro sanitario y sin registro sanitario. Véase la tabla N° 8 en comparación con los resultados obtenidos de la tabla N°10.
- El análisis de los resultados fue basado en el método HET CAM cualitativo y en el método HET CAM (CAMS-TBS) cuantitativo mostrando este último los datos más precisos al ser un método instrumental en el que se emplea el espectrofotómetro de luz UV. Véase la tabla N° 15 y 16.
- Luego del análisis de los resultados, basados en el método HET CAM (CAM-TBS) se obtuvo como resultado que las cremas con registro sanitario que no presentan irritabilidad considerable para el contorno de los ojos, tal como se muestra en la tabla N° 16.

Sin embargo, las cremas sin registro sanitario presentan una irritabilidad muy elevada tal como se muestra en la tabla N° 15.

Sin embargo, las cremas sin registro sanitario presentan una irritabilidad muy elevada en ambos métodos tal como se muestra en la tabla N° 18.

- Respecto al objetivo de determinar cualitativamente la proporción del daño en el tejido ya sea lisis, hemorragia o coagulación, se puede afirmar que fue logrado ya que se pudo determinar el daño producido en el tejido del contorno de ojos, que producen las cremas con registro sanitario y sin registro sanitario que este último presenta la mayor lesión lo que demuestra que son más irritantes en comparación con las cremas registradas. empleando como muestra los huevos de gallina en estado de incubación.
- El objetivo de determinar la cantidad de tinción de azul de tripán adsorbido del tejido dañado en el análisis cuantitativo fue logrado con éxito empleando para ello el procedimiento establecido en el protocolo internacional INVITOX N° 108. En el procedimiento se preparó la muestra, que fueron los huevos de gallina en estado de incubación, y se analizó a partir de la curva de calibración, elaborada con los estándares a diferentes concentraciones, para posteriormente interpolar los datos obtenidos y calcular la cantidad de azul de tripán absorbido. Véase gráfico N° 01 y Tabla N° 11. Con los resultados se determinó la cantidad de azul de tripán absorbido en cada muestra de la crema con y sin registro sanitario, mediante los datos de absorbancia obtenidos en los análisis y basándose en la Tabla N° 04. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS.

## VI CONCLUSIONES

- Se determinó el índice de irritabilidad ocular in vitro mediante los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cremas cosméticas (contorno de ojos) con registro sanitario y sin registro sanitario, observando las alteraciones de lisis, hemorragia y coagulación producidas en las muestras de huevos de gallina en periodo de incubación y determinando la cantidad de colorante de azul de tripán absorbido.
- Se comparó el nivel de irritabilidad ocular entre cremas con registro sanitario y sin registro sanitario, obteniendo como resultado, luego de análisis realizado, que las cremas sin registro sanitario son altamente irritantes para el contorno de ojos de las personas que lo utilicen, mientras que las cremas con registro sanitario tienen una irritabilidad baja y no representa un gran riesgo para las personas. Véase tabla N° 8 y N° 10 muestran los resultados del HET-CAM y Tablas N° 15 y 16 muestran los resultados finales de CAM- TBS.
- Se determinó cualitativamente y cuantitativamente la proporción de daño en el tejido corioalantoidea del huevo de gallina en estado de incubación que estuvieron al expuestas a la solución de las formulaciones cosméticas, lo cual se determinó que de todas las cremas analizadas con registro sanitario en HET-CAM la crema Portugal Q10 contorno de ojos y la crema contorno de ojos Cicatricure son no irritantes en comparación con las demás obtuvieron resultados de irritante leve. Véase tabla N° 18
- Se determinó la cantidad de tinción de azul de tripán adsorbido por el tejido corioalantoidea del huevo de gallina dañado, en el análisis cuantitativo, lo que confirmó de que en todas las cremas analizadas con registro sanitario dieron resultado no irritantes véase tabla la tabla N° 18 de acuerdo con la clasificación de irritabilidad de la tabla N° 04 ,Sin embargo en las cremas sin registro sanitario Crema Concha de Nácar, Crema de Sábila, Crema de Baba de caracol

obtuvieron como resultados muy irritante de acuerdo a la clasificación de irritabilidad de la tabla N° 04., en comparación con las cremas Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera y Crema de Aloe vera y Extracto de Pepino que son irritante moderado véase la tabla N°18.

## VII RECOMENDACIONES

- Tal como se detalla en la presente investigación, diversos estudios han señalado la alta correlación entre los resultados alcanzados entre el método alternativo HET-CAM cualitativo, el método HET-CAM cuantitativo (CAM -TBS) y las pruebas *in vivo*, por el método de Draize. Por lo que se recomienda innovar y disponer de métodos nuevos y científicamente más avanzados para una mayor relevancia que los procedimientos actuales basados en animales y a si poner en práctica una nueva toxicología reguladora si se quiere buscar la protección de los seres humanos y el medio ambiente.
- Se recomienda continuar con los estudios de irritabilidad con los principios activos, excipientes, extractos que forman parte de las formulaciones cosméticas así como también los productos terminados, dermocosméticos, dermatológicos, capilares y diversos tratamientos que concierne al contacto con la piel.
- El área de toxicología reguladora es una área fascinante, la negativa de ciertos sectores a la utilización de animales de experimentación pone en manifiesto la existencia de cuestiones éticas y sociales relacionado con la investigación científica lógicamente, la mayor presión social en lo que se refiere a la oposición al uso de animales que se produce cuando se trata de ensayar cosméticos debido a que no se consideran productos absolutamente necesarios para la salud humana, lo cual se recomienda que se tome la debida importancia a la línea cosmética porque tiene contacto con la piel y asu ves ingresa al organismo como prueba de ello son las reacciones que refieren y se comprueban en la

presente tesis con cremas cosméticas contorno de ojos con registro sanitario y sin registro sanitario.

- Se recomienda impulsar al sector salud en la promoción y prevención para brindar información a la comunidad de la importancia de adquirir productos cosméticos con registro sanitario normalizados por DIGEMID brindando garantía de una buena salud y calidad de vida así evitamos intoxicaciones y reacciones desfavorables al usar una crema cosmética que no cumpla su función y muy al contrario atente con vida humana.
- A la culminación del presente trabajo se recomienda que se note la debida importancia del rol del profesional Químico Farmacéutico que mediante la rama de la toxicología es el único y responsable de verificar, analizar y estudiar los efectos de los productos tóxicos o venenosos sobre el organismo para que se rijan mediante la normativa de DIGEMID y se brinde la comercialización de productos de calidad.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaufam P; Alm A. Fisiología del ojo. Elsevier, 2004 [Consultado el 20 de octubre de 2017] Disponible en: <https://books.google.es/books?id=01mHDarbV9UC&pg=PA214&dq=presbicia&cd=3&hl=es#v=onepage&q=presbicia&f=false>
2. Álvaro, M; Moreno P. Fundamentos de visión binocular. Universidad de Valencia, 2004, Isbn 84-7908-797-8
3. Nayeli, R. Contorno de Ojos. Biomantial. Perú, 2008. [Consultado el 20 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://www.biomanantial.com/contorno-de-ojos-a-129-es.html>
4. Wilhemus, J. Introduction and rationales for the proposed use of in vitro test methods to identify ocular corrosives and severe irritants. Nih Publication nro 06-4515, Marzo2006. [Fecha de acceso: 2 de agosto del 2017]. Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox.../icel-508.pd>
5. Balls, M; Bothan PA, Spielmann H. The EC (European Comision)/HO (British Home Office) International calidation study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. Toxicol In Vitro 1995;9(6):871-29.
6. Inocente M.; Toscano E.; Castañeda B. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método HET-CAM. *Horizonte Medico* 2013; 13 (2):12-18.
7. Batista M, Murillo G, Pérez U, Et al. Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AFCO1 por el método de Het-Cam. *VacciMonitor* 2011; 20 (1):22-27. La Habana, 2011.

8. González, Y; Castillo, O; Sánchez, C; Molina, J; Pizarro, A; Silveira, E. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba en conejos. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ®, ISSN 1695-7504, Vol. VII, n° 03, Marzo/2006, España. [consultado 20 oct 2017]; Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y más específicamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030306.html>
9. Murillo, G.; Pérez, U.; Tur, E.; Vinardell, MP.; García, G.; Pascual, JR. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular Revista de Toxicología, vol. 20, núm. 3, pp. 187-192 Asociación Española de Toxicología, España, 2003.
10. García, D. Evaluación toxicológica a los sólidos pulverulentos de Parthenium hysterophoru, L; empleando dos técnicas alternativas. [Tesis de licenciatura] Universidad Central Marta Abreu De Las Villas; 2007.
11. Martínez, V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido. [Tesis de Licenciatura] Universidad de Barcelona; España, 2017.
12. 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”. [Tesis de Maestría] UNMSM; 2015
13. Churampi, L y Montes, E., Evaluación de la actividad Antiinflamatoria del extracto etanólico del fruto de passiflora mollissima (kunth) l.h.bailey “tumbo serrano” y su uso como activo biológico en industria cosmética, [Tesis de Licenciatura] UNMSM; 2015
14. Camones MA, Toscano EM, Guerra MA, Castañeda J .Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam. Horizonte Médico, vol. 13, núm. 2, abril-junio, 2013, pp. 12-18 Universidad de San Martín de Porres La Molina.

15. Ruiz, C y Ushiñahua, R (2013). Evaluación del potencial irritante de la crema cosmética "baba de caracol & concha de naçar" comercializada en el mercado de belén en *Oryctolagus cuniculus* cepa New Zealand - Iquitos 2012. [Tesis de Licenciatura]. Universidad de la Amazonía Peruana. Perú, 2013. [consultado 20 oct 2017]; Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/4764>
16. Tortora, Derricson. Principios de anatomía y fisiología. 11 edición, 2006. ISBN 968-7988-77-0
17. Rodríguez, M. Contorno de Ojos. Revista virtual Farmacéutica: Consejos de tu Farmacéutico. Perú, 2015. [Fecha de acceso: 12 de septiembre 2017]. Disponible: <http://www.consejosdetufarmaceutico.com/contorno-de-ojos-belleza/#3qkobLTF9VqHgDXv.99>
18. Minsa. Manual de buenas prácticas de manufactura de productos cosméticos. RM nro 518-99-SA/DM 20.10.1999. [Fecha de acceso: 3 de septiembre del 2017]. Disponible en: <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/1999/RM518-1999.pdf>
19. Digemid. Decisión 516. Armonización de legislación en materia de productos cosméticos en la comunidad andina. [en línea]. Fecha de acceso: 23 de septiembre. Disponible en: [www.digemid.minsa.gob.pe/upload/uploaded/pdf/decision5166.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/upload/uploaded/pdf/decision5166.pdf)
20. Altunagia J, Cantero L, Figueredo N, et al . Calidad sanitaria de cosméticos de producción nacional y de importación durante 1999. Revista cubana: Alimentos y Nutrición. 2001; pg.15.
21. Diario Perú 21, Más de una tonelada de cosméticos adulterados fueron incautados en el centro de lima. Perú: Perú 21; 2016. Fecha de acceso: 4 de septiembre 2017. Disponible en: <https://peru21.pe/lima/tonelada-cosmeticos-adulterados-incautados-galeria-jiron-paruro-fotos-227783>

22. Camí J, Marruecos L, Sant L, et.al. Los signos y síntomas resultados de la acción de un toxico. Sección 18Toxicología 4/2009. Fecha de acceso: 18 de agosto 2017. Disponible en: <http://www.sepap.es/libros/farreras13/SECCION/SEC18.PDF>
23. Olaru A. Aditivos en cosméticos. En buenas manos [en línea] <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=1679>
24. Werner (2017) Experta alerta de ingredientes tóxicos en cosméticos pueden afectar a salud. Viernes, 21/07/2017. Fecha de acceso: 1 de septiembre. Disponible en: [www.elperiodico.com/es/sociedad/20170721/experta-alerta-de-ingredientes-toxicos-en-cosmeticos-pueden-afec](http://www.elperiodico.com/es/sociedad/20170721/experta-alerta-de-ingredientes-toxicos-en-cosmeticos-pueden-afec).
25. Cosmética Casera . Cremas caseras con ingredientes toxicos. Revista Cosmética Casera [en línea] 5 de julio del 2012. :shop.<http://www.cremas-caseras.com/2012/01/ingredientes-toxicos-en-cosmeticos.html>
26. Llovet E. ¿Pueden los cosméticos perjudicar tus ojos?. Revista Hola com.[en línea] 21.o2.2012. <https://www.hola.com/salud/2012022157064/como-afectan-cosmeticos-ojos/>
27. Bruner LH. In vitro toxicity testing. New Yorke: Marcel Dekker,INC.:1992:149-190. Fecha de acceso :4 de agosto del 2017. Disponible en : : <https://books.google.com.pe/books?isbn=0824798554>
28. Bruner L , De Silva O, Spielmann H, Et al . Report of the COLIPA workshop on mechanism of eye irritation,1998,pg:811-30. Fecha de acceso :4 de agosto del 2017. Disponible en : [scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reference.php?pid=S0034](http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reference.php?pid=S0034)
29. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria/Brasil. Ministerio de Salud. Guía para la Evaluación de la Seguridad de productos cosméticos.[en línea] Brasilia 2003. Fecha de acceso: 07 de septiembre del 2017. Disponible en: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a546f480486402b78e168f2b>

30. Draize J.; Woodard G.; Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Experim Therapeutics* 1944; 22: 372-90. Fecha de acceso: 6 de septiembre. Disponible en: [scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reference.php?pid=S003](http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reference.php?pid=S003)
31. Tabón F, Vallejo J. Perfil de tolerancia ocular de un cosmético para bebe en vivo. *Revista Cubana de Farmacia*, vol. 46 nro. 1. La habana en-mzo 2012. Versión impresa ISSN 0034-7515.
32. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Guideline No. 405: acute eye irritation/corrosion. OECD Publication Office, París, 1987.
33. ISO 10993-10 (1996). Biological evaluation of medical devices. Part 10: Test for irritation and sensitization. European Committee for Standardization.
34. Balls M.; Brantom P.; Cassidy S.; Esdaile D.; Fentem J.; Liebsch M.; et al. Preliminary evaluation of the application of reference standards in the prevalidation and validation of in vitro test for eye irritation. In: DG Clark, SG Lisansky and R Macmillan: *Alternatives to animal testing II, proceedings*, Brussels: CPL Press; 1999. p. 201-206
35. Hanamura K, Miyamoto S, Konishi Y. Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics predictor of Draize eye irritation scores. 1995, pg. 333-40.
36. Luepke N.P. y Kemper F.H. The Het-Cam test: An alternative to the Draize eye test. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, n° 6/7, 495-496). Publicado en el Diario Oficial de la República Francesa del 26 de diciembre de 1996
37. Spielmann H. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint. Pape W.; Pfannenbecker U.; Hoppe U. Validation of the red blood

cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology* 1990; 1: 525-536.

38. Steiling W.; Brachter M.; Coutellemont P.; De Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 375-384

39. Itagaki H., Hagino S.; Kato S. The Ergatt/Frame, data bank of in vitro techniques in toxicology. CAM-TBS test. (Invitox Protocol 108). 1995:42

40. Balls M.; Brantom P.; Cassidy S.; Esdaile D.; Fentem J.; Liebsch M.; et al. Preliminary evaluation of the application of reference standards in the prevalidation and validation of in vitro test for eye irritation. In: DG Clark, SG Lisansky and R Macmillan: Alternatives to animal testing II, proceedings, Brussels: CPL Press; 1999. p. 201-20

41. Knight D, Breheny D. Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *ATLA* 2002; 30:7-22

42. Martínez V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido. Universidad de Barcelona.2007.

43. Bermúdez G, Martínez et al. Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante de la crema ulceprol. *Anuario de la Sociedad Cubana de Toxicología*. Vol 1 Nro 1, pg 93-97., 2001

44. Spielmann H. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint. Pape W.; Pfannenbecker U.; Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology* 1990;

45. Leighton J, Nassauer J, Tchao R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and chemical toxicology* 23, pg. 293-298.1985
46. Bagley D, Rizvi P, Kong B, et al. Factors affecting use of the hens egg chorioallantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential. *Journal of toxicology/Cutaneous and ocular toxicology* 1991; 10: 95-104.
47. Bagley D, Bruner L, De Silva O, et al. An evaluation of five potential alternatives in vitro to the rabbit eye irritation test in vivo. *Toxicology in vitro* 1992; 6: 136-149. 49.
48. Bagley D, Waters D, Kong B. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Food and Chemical Toxicology* 1994, pg 1155-1176
49. Higino 1991, 1993 pg 301-304 y 35-39 Itagaki H., Hagino S.; Kato S. The Ergatt/Frame, data bank of in vitro techniques in toxicology. CAM-TBS test. *Invittox Protocol* 108. 1995:1
50. Itagaki H., Hagino S.; Kato S. The Ergatt/Frame, data bank of in vitro techniques in toxicology. CAM-TBS test. (*Invittox Protocol* 108). 1995:1
51. Hagino S.; Kinoshita S.; Tani N.; Nakamura T.; Ono N.; Konishi K.; et al. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. *Toxicology in vitro*. 1993; 7: 35-39.
52. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985; 23: 287-91.
53. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, de Silva O. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. *Toxicol Vitro*. 1999; 13: 375-84

54. Journal Officiel de la Republique Française. Aretê du 27 decembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au controle de la composition dès produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officielle d'évaluation du potencial irritant par application sur la membrane chorioallantoidienne del'oeuf de poule. 1996. 19137-19138.
55. Joint Research Centre. EURL ECVAM. Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) INVITTOX n° 96. [Monografía en Internet]. [Citado 27 de enero de 2014]. Disponible en: [http://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu/view\\_doc.cfm?iddoc=777&tdoc=met](http://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu/view_doc.cfm?iddoc=777&tdoc=met)
56. Fernández A, Gonzales M, Gil M Et al. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. Farm Hosp. 2014;38(4):300-304
57. Fernández A, Gonzales M, Gil M Et al. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. Farm Hosp. 2014;38(4):300-304
58. Instituto Valenciano de Microbiología. Prueba de irritación de mucosas HET-CAM. [en línea] [www.ivami.com/.../711-prueba-het-cam-hen-s-egg-test-chorioallantoid-membrane-irr](http://www.ivami.com/.../711-prueba-het-cam-hen-s-egg-test-chorioallantoid-membrane-irr)
59. Balls M. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. Toxicology in vitro 1995; 9:871-929.
60. Ying Y, Xinfeng Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, et al. Combinated in vitro test as an alternative to in vivo eye irritation tests. ATLA 2010;38: 303-14.
61. Bagley D.; Bruner L.; De Silva O.; Cottin M.; O'Brien K.; Uttley M.; et al. An evaluation of five potential alternatives in vitro to the rabbit eye irritation test in vivo. Toxicology in vitro 1992; 6: 136-149

62. Rougier A.; Cottin M.; De Silva O.; Catroux P.; Roguet R.; Dossou KG.; et al. The use of in vitro methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. *Toxicology In vitro*. 1994; 8: 893-905.
63. Gettings S.; Lordo R.; Hintze K.; Bagley D.; Casterton P.; Chudkowski M.; et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase III) Surfactant-based formulations. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34: 79-117
64. Gettings S.; Teal J.; Bagley D.; Demetrulias J.; Di Pasquale L.; Hintze K.; et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase I) hydroalcoholic formulations; (part 2) data analysis and biological significance. *Toxicology in vitro* 1991; 4(4): 247-288.
65. Gettings S.; Dipasquale L.; Bagley D.; Casterton P.; Chudkowski M.; Curren R. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of in vitro alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II), oil/water emulsions. *Food and chemical toxicology* 1994; 32(10): 943- 976
66. Steiling W.; Brachter M.; Coutellemont P.; De Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 375-384
67. Brantom P.; Bruner L.; Chamberlain M.; De Silva O.; Dupuis J.; Earl L.; et al. A Summary Report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test. *Toxicology in vitro* 1997; 11: 141 – 179.
68. Balls M.; Botham P.; Bruner L.; Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test.; *Toxicology in vitro* 1995<sup>a</sup>; 9(6): 871-929.
69. Prescott, L.M. *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. ISBN 84-486-0261-7 1999 modificar

70. Beckers, LJA; Baragona, M; Shulepov, S; Vliegenthart, T; van Doorn, AR . MECHANICAL CELL LYSIS DEVICE (en inglés). 2010.
71. Eskes C.; Bessou S.; Bruner L.; et al. Subchapter 3.3.Eye Irritation. In: Eskes C, Zuang V, eds. Alternative (non-animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects. ATLA 2005; 33(1):47-81
72. Rougier A.; Cottin M.; De Silva O.; Catroux P.; Roguet R.; Dossou KG.; et al. The use of in vitro methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. Toxicology In vitro. 1994; 8: 893-905.
73. Spielmann H. Ocular irritation. In vitro methods in pharmaceutical research. Castell J. and Gomez-Lechon M. editors. Academic Press; 1997. p. 265-287
74. Steiling W.; Brachter M.; Coutellemont P.; De Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. Toxicology in vitro 1999; 13: 375-384.
75. 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”. [Tesis de Maestría] Unmsm; 2015
76. Spielmann H. The Ergatt/Frame, data bank of in vitro techniques in toxicology. HET-CAM Test. Invitox Protocol 47 1992: 1-9
77. Garrote, A. y Bonet, R. Belleza y cuidado de los ojos. Dermofarmacia. OFFARM (Vol. 25). 2006
78. Olivares R, Registro sanitario y su importancia para la empresa, Guatemala 2016 [consultado 20 oct 2017]; disponible en: <http://latinalliance.co/registro-sanitario-importancia-las-empresas/78>

79. Lüpke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic*. 1985; 23:287-291.
80. Spielmann H. HET-CAM Test. The ERGATT/FRAME Databank of in vitro techniques (INVITTOX). 1992; IP-47;1-9.
81. Steiling W. The hen's egg test on the chorioallantoic membrane. The ERGATT/FRAME database of in vitro techniques (INVITTOX). 1994; IP-96: 1-23.
82. Balls M, Berg N, Bruner LH, Curren RD, de Silva O, Earl LK, Esdaile DJ, Fentem JH, Liebsch M, Ohno Y, Prinsen MK, Spielmann H, Worth AP. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. *ATLA*.1999; 27: 53-77.
83. Knight DJ, Breheny D. Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *ATLA* 30:7-22. ECETOC 1998 Eye irritation-reference chemicals data bank.
84. Castillo, R. La hipótesis en investigación, en *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, 2009.
85. Hurtado, J. Investigación holística. Caracas: Fundación Sypal-Magisterio, 2000.
86. Ludewig, C. Universo y Muestra. Colegio mexicano de ortopedia y traumatología. Mexico, 2007.
87. Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, M. Metodología de la investigación científica. México: Mc Graw-Hill, 2010.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Resultados obtenidos por el número de muestras del método HET-CAM cualitativo de cremas con y sin registro.

**Tabla 19.** Datos obtenidos de muestras con Registro Sanitario - Cualitativo

MUESTRAS CON REGISTRO SANITARIO	N° MUESTRA	N° HUEVO	TIEMPO DE REACCIÓN (SEGUNDOS)			
			H*	L*	C*	
Crema Portugal	M1	01	301	264	301	
		02	301	263	301	
		03	301	265	301	
	M2	01	301	266	301	
		02	301	268	301	
		03	301	268	301	
	M3	01	301	263	301	
		02	301	269	301	
		02	301	266	301	
	M4	01	301	265	301	
		02	301	264	301	
		03	301	266	301	
			01	301	267	301

	M5	02	301	266	301	
		03	301	265	301	
	M6	01	301	266	301	
		02	301	264	301	
		03	301	265	301	
	Crema Barbaría	M1	01	301	255	301
02			301	256	301	
03			301	260	301	
M2		01	301	259	301	
		02	301	260	301	
		03	301	254	301	
M3		01	301	253	301	
		02	301	255	301	
		03	301	254	301	
M4		01	301	252	301	
		02	301	254	301	
		03	301	255	301	
M5		01	301	255	301	
		02	301	255	301	
		03	301	256	301	
			01	301	254	301

	M6	02	301	255	301	
		03	301	256	301	
Crema Cicatricure	M1	01	301	269	301	
		02	301	272	301	
		03	301	273	301	
	M2	01	301	271	301	
		02	301	269	301	
		03	301	270	301	
	M3	01	301	274	301	
		02	301	273	301	
		03	301	270	301	
	M4	01	301	301	301	
		02	301	273	301	
		03	301	301	301	
	M5	01	301	301	301	
		02	301	301	301	
		03	301	274	301	
	M6	01	301	301	301	
		02	301	301	301	
		03	301	301	301	
			01	301	256	301

Crema Nívea	M1	02	301	258	301	
		03	301	259	301	
	M2	01	301	255	301	
		02	301	254	301	
		03	301	253	301	
	M3	01	301	257	301	
		02	301	257	301	
		03	301	258	301	
	M4	01	301	259	301	
		02	301	258	301	
		03	301	257	301	
	M5	01	301	256	301	
		02	301	258	301	
		03	301	255	301	
	M6	01	301	257	301	
		02	301	257	301	
		03	301	258	301	
	Crema Ponds	M1	01	301	259	301
			02	301	258	301
			03	301	257	301
		M2	01	301	256	301
			02	301	258	301

		03	301	255	301
	M3	01	301	257	301
		02	301	257	301
		03	301	257	301
	M4	01	301	255	301
		02	301	257	301
		03	301	258	301
	M5	01	301	257	301
		02	301	257	301
		03	301	256	301
	M6	01	301	257	301
		02	301	258	301
		03	301	257	301

**Tabla 20.** Datos obtenidos de muestras sin Registro Sanitario - Cualitativo

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	N° MUESTRA	N° HUEVO	TIEMPO DE REACCIÓN (SEGUNDOS)			
			H*	L*	C*	
Crema concha de nácar	M1	01	214	210	215	
		02	214	212	215	
		03	212	211	212	
	M2	01	212	210	212	
		02	214	210	214	
		03	214	211	215	
	M3	01	213	211	214	
		02	213	212	213	
		03	214	211	215	
	M4	01	211	213	211	
		02	211	214	212	
		03	211	213	212	
	M5	01	212	211	213	
		02	211	210	213	
		03	212	210	213	
	M6	01	212	211	213	
		02	211	210	213	
		03	211	209	213	
		M1	01	204	201	208
			02	205	202	207
			03	206	201	206
			01	206	205	207

Crema de Sábila	M2	02	206	203	208	
		03	206	204	209	
	M3	01	206	201	209	
		02	205	204	207	
		03	206	204	208	
	M4	01	203	201	205	
		02	206	201	208	
		03	207	203	208	
	M5	01	203	202	206	
		02	204	201	208	
		03	206	204	207	
	M6	01	203	200	206	
		02	204	202	208	
		03	206	204	207	
	Crema Baba de Caracol	M1	01	198	195	200
			02	196	194	199
			03	195	191	198
		M2	01	196	195	197
02			197	193	199	
03			197	193	198	
M3		01	197	193	199	
		02	191	193	195	
		03	194	191	197	
M4		01	195	193	199	
		02	196	194	198	
		03	197	195	198	
M5		01	194	191	197	
		02	192	191	197	
		02	195	193	198	
			01	194	193	197

	M6	02	192	191	197	
	M6	03	195	193	198	
Crema Rosa Mosqueta, baba de caracol y Aloe Vera	M1	01	204	201	206	
		02	200	194	209	
		03	210	193	206	
	M2	01	204	200	206	
		02	203	195	207	
		03	204	201	206	
	M3	01	200	193	202	
		02	203	200	204	
		03	197	193	206	
	M4	01	204	201	206	
		02	201	195	205	
		03	203	197	205	
	05	01	204	201	206	
		02	201	195	205	
		03	203	197	205	
	M6	01	202	200	206	
		02	202	206	207	
		03	207	204	208	
	Crema Aloe vera y extracto de pepino	M1	01	204	201	206
			02	203	195	207
			03	204	201	206
		M2	01	200	198	202
			02	203	200	204
			03	197	193	206
M3		01	204	202	206	
		02	203	196	205	
		03	201	201	203	
M4		01	204	201	206	
		02	201	196	205	

		03	201	202	203
	M5	01	204	201	206
		02	203	196	204
		03	201	200	203
	M6	01	204	201	206
		02	203	196	201
		03	201	199	203

**ANEXO 2. Resultados obtenidos del método CAM-TBS por el número de muestras cuantitativo de cremas con y sin registro.**

**Tabla 21.** Datos Obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	Nº MUESTRA	Nº HUEVO	PESO DE MEMBRANA (mg)	LONG DE ONDA (nm)	ABSORB ANCIA
Crema concha de nácar	M1	01	401,2	580	1,458
		02	400,8	580	1,358
		03	401,2	580	1,408
	M2	01	400,1	580	1,386
		02	405,4	580	1,348
		03	400,5	580	1,412
	M3	01	403,2	580	1,457
		02	400,8	580	1,389
		03	405,1	580	1,421

	M4	01	401,5	580	1,025	
		02	403,2	580	1,432	
		03	405,4	580	1,056	
	M5	01	405,7	580	1,122	
		02	400,7	580	1,258	
		03	405,8	580	1,387	
	M6	01	402,4	580	1,410	
		02	405,4	580	1,258	
		03	406,8	580	1,344	
Crema de Sábila	M1	01	701.0	580	1.573	
		02	701.9	580	1.576	
		03	700.5	580	1.571	
	M2	01	702.3	580	1.570	
		02	701.5	580	1.570	
		03	700.1	580	1.569	
	M3	01	705.1	580	1.542	
		02	701.4	580	1.555	
		03	701.6	580	1.580	
	M4	01	700.1	580	1.574	
		02	701.6	580	1.581	
		03	699.4	580	1.546	
			01	700.8	580	1.594

	M5	02	701.6	580	1.573
		03	704.1	580	1.581
	M6	01	700.6	580	1.567
		02	700.0	580	1.570
		03	702.1	580	1.575
Crema Baba de Caracol	M1	01	700.2	580	1.308
		02	700.7	580	1.307
		03	703.6	580	1.309
	M2	01	701.3	580	1.370
		02	701.6	580	1.370
		03	702.1	580	1.369
	M3	01	701.1	580	1.342
		02	708.4	580	1.355
		03	703.6	580	1.380
	M4	01	702.1	580	1.374
		02	701.1	580	1.381
		03	700.4	580	1.346
	M5	01	705.8	580	1.299
		02	704.6	580	1.303
		03	708.1	580	1.381
	M6	01	703.6	580	1.367
		02	709.5	580	1.370

		03	705.1	580	1.375
Crema rosa mosqueta, baba de caracol y aloe vera	M1	01	651.1	580	0.447
		02	652.3	580	0.449
		03	658.2	580	0.446
	M2	01	650.2	580	0.458
		02	650.2	580	0.448
		03	650.2	580	0.469
	M3	01	650.2	580	0.442
		02	650.2	580	0.455
		03	653.6	580	0.480
	M4	01	642.1	580	0.474
		02	651.1	580	0.481
		03	650.4	580	0.446
	M5	01	655.8	580	0.499
		02	654.6	580	0.473
		03	658.1	580	0.481
	M6	01	643.6	580	0.467
		02	649.5	580	0.470
		03	665.1	580	0.475
	M1	01	738.1	580	0.547
		02	740.1	580	0.549

Crema de aloe vera extracto de pepino		03	734.1	580	0.546
	M2	01	730.2	580	0.558
		02	740.2	580	0.548
		03	738.2	580	0.569
	M3	01	741.0	580	0.542
		02	734.2	580	0.555
		03	732.9	580	0.580
	M4	01	741.2	580	0.574
		02	740.1	580	0.581
		03	739.1	580	0.546
	M5	01	741.0	580	0.599
		02	735.0	580	0.573
		03	737.1	580	0.581
	M6	01	736.9	580	0.567
		02	736.8	580	0.570
		03	738.9	580	0.575

**Tabla 22.** Resultados del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	Nº MUE STRA	Nº HUEVO	CONCENTRACIÓN COLORANTE Moles/mg	CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICA CIÓN
Crema concha de nácar	M1	01	$1,1279 \times 10^{-7}$	0,5639	Muy irritante
		02	$1,0503 \times 10^{-7}$	0,5252	Muy irritante
		03	$1,0886 \times 10^{-7}$	0,5443	Muy irritante
	M2	01	$1,0742 \times 10^{-7}$	0,5371	Muy irritante
		02	$1,0306 \times 10^{-7}$	0,5153	Muy irritante
		03	$1,0936 \times 10^{-7}$	0,5468	Muy irritante
	M3	01	$1,1215 \times 10^{-7}$	0,5608	Muy irritante
		02	$1,0747 \times 10^{-7}$	0,5374	Muy irritante
		03	$1,0882 \times 10^{-7}$	0,5441	Muy irritante
	M4	01	$7,8697 \times 10^{-8}$	0,3935	Muy irritante
		02	$1,102 \times 10^{-7}$	0,5510	Muy irritante
		03	$8,0351 \times 10^{-8}$	0,4018	Muy irritante
	M5	01	$8,5422 \times 10^{-8}$	0,4271	Muy irritante
		02	$9,7191 \times 10^{-8}$	0,4860	Muy irritante
		03	$1,0599 \times 10^{-7}$	0,5300	Muy irritante
	M6	01	$1,0869 \times 10^{-7}$	0,5435	Muy irritante
		02	$9,6064 \times 10^{-8}$	0,4803	Muy irritante

		03	$1,024 \times 10^{-7}$	0,5120	Muy irritante
Crema de Sábila	M1	01	$6.9725 \times 10^{-8}$	0.3486	Muy irritante
		02	$6.9771 \times 10^{-8}$	0.3489	Muy irritante
		03	$6.9685 \times 10^{-8}$	0.3484	Muy irritante
	M2	01	$6.9461 \times 10^{-8}$	0.3473	Muy irritante
		02	$6.9541 \times 10^{-8}$	0.3477	Muy irritante
		03	$6.9635 \times 10^{-8}$	0.3482	Muy irritante
	M3	01	$6.7933 \times 10^{-8}$	0.3397	Muy irritante
		02	$6.8876 \times 10^{-8}$	0.3444	Muy irritante
		03	$6.998 \times 10^{-8}$	0.3499	Muy irritante
	M4	01	$6.986 \times 10^{-8}$	0.3493	Muy irritante
		02	$7.0025 \times 10^{-8}$	0.3501	Muy irritante
		03	$6.8667 \times 10^{-8}$	0.3433	Muy irritante
	M5	01	$7.069 \times 10^{-8}$	0.3535	Muy irritante
		02	$6.9666 \times 10^{-8}$	0.3483	Muy irritante
		03	$6.9777 \times 10^{-8}$	0.3489	Muy irritante
	M6	01	$6.9495 \times 10^{-8}$	0.3475	Muy irritante
		02	$6.969 \times 10^{-8}$	0.3484	Muy irritante
		03	$6.9706 \times 10^{-8}$	0.3485	Muy irritante
	M1	01	$5.7871 \times 10^{-8}$	0.2894	Muy irritante
		02	$5.7784 \times 10^{-8}$	0.2889	Muy irritante
		03	$5.7636 \times 10^{-8}$	0.2882	Muy irritante

Crema Baba de Caracol	M2	01	$6.0568 \times 10^{-8}$	0.3028	Muy irritante	
		02	$6.0542 \times 10^{-8}$	0.3027	Muy irritante	
		03	$6.0454 \times 10^{-8}$	0.3023	Muy irritante	
	M3	01	$5.9325 \times 10^{-8}$	0.2966	Muy irritante	
		02	$5.9293 \times 10^{-8}$	0.2965	Muy irritante	
		03	$6.0818 \times 10^{-8}$	0.3041	Muy irritante	
	M4	01	$6.0678 \times 10^{-8}$	0.3034	Muy irritante	
		02	$6.108 \times 10^{-8}$	0.3054	Muy irritante	
		03	$5.9565 \times 10^{-8}$	0.2978	Muy irritante	
	M5	01	$5.7009 \times 10^{-8}$	0.2850	Muy irritante	
		02	$5.7285 \times 10^{-8}$	0.2864	Muy irritante	
		03	$6.0476 \times 10^{-8}$	0.3024	Muy irritante	
	M6	01	$6.0235 \times 10^{-8}$	0.3012	Muy irritante	
		02	$5.9868 \times 10^{-8}$	0.2993	Muy irritante	
		03	$6.0465 \times 10^{-8}$	0.3023	Muy irritante	
		M1	01	$2.0535 \times 10^{-8}$	0.1027	Irritante Moderado
			02	$2.0594 \times 10^{-8}$	0.1030	Irritante Moderado
			03	$2.0266 \times 10^{-8}$	0.1013	Irritante Moderado
		01	$2.1097 \times 10^{-8}$	0.1055	Irritante Moderado	

Crema rosa mosqueta, baba de caracol y aloe vera	M2	02	$2.0612 \times 10^{-8}$	0.1031	Irritante Moderado
		03	$2.163 \times 10^{-8}$	0.1082	Irritante Moderado
	M3	01	$2.0321 \times 10^{-8}$	0.1016	Irritante Moderado
		02	$2.0951 \times 10^{-8}$	0.1048	Irritante Moderado
		03	$2.2049 \times 10^{-8}$	0.1102	Irritante Moderado
	M4	01	$2.2149 \times 10^{-8}$	0.1107	Irritante Moderado
		02	$2.2182 \times 10^{-8}$	0.1109	Irritante Moderado
		03	$2.0509 \times 10^{-8}$	0.1025	Irritante Moderado
	M5	01	$2.2888 \times 10^{-8}$	0.1144	Irritante Moderado
		02	$2.1678 \times 10^{-8}$	0.1084	Irritante Moderado
		03	$2.1946 \times 10^{-8}$	0.1097	Irritante Moderado
	M6	01	$2.1754 \times 10^{-8}$	0.1088	Irritante Moderado
		02	$2.1702 \times 10^{-8}$	0.1085	Irritante Moderado

		03	$2.143 \times 10^{-8}$	0.1072	Irritante Moderado
Crema de aloe vera extracto de pepino	M1	01	$2.2387 \times 10^{-8}$	0.1119	Irritante Moderado
		02	$2.2412 \times 10^{-8}$	0.1121	Irritante Moderado
		03	$2.2466 \times 10^{-8}$	0.1123	Irritante Moderado
	M2	01	$2.3104 \times 10^{-8}$	0.1155	Irritante Moderado
		02	$2.2366 \times 10^{-8}$	0.1118	Irritante Moderado
		03	$2.3324 \times 10^{-8}$	0.1166	Irritante Moderado
	M3	01	$2.2086 \times 10^{-8}$	0.1104	Irritante Moderado
		02	$2.2849 \times 10^{-8}$	0.1142	Irritante Moderado
		03	$2.3966 \times 10^{-8}$	0.1198	Irritante Moderado
	M4	01	$2.3442 \times 10^{-8}$	0.1172	Irritante Moderado
		02	$2.3775 \times 10^{-8}$	0.1189	Irritante Moderado
		03	$2.2314 \times 10^{-8}$	0.1116	Irritante Moderado

	M5	01	$2.4512 \times 10^{-8}$	0.1226	Irritante Moderado
		02	$2.3597 \times 10^{-8}$	0.1180	Irritante Moderado
		03	$2.3872 \times 10^{-8}$	0.1194	Irritante Moderado
	M6	01	$2.3279 \times 10^{-8}$	0.1164	Irritante Moderado
		02	$2.3411 \times 10^{-8}$	0.1171	Irritante Moderado
		03	$2.3558 \times 10^{-8}$	0.1178	Irritante Moderado

**Tabla 23.** Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos sin registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	Nº MUESTRA	PROMEDIO CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Crema concha de nácar	M1	$0.5445 \pm 0,0194$	Muy irritante
	M2	$0.5331 \pm 0.0161$	Muy irritante
	M3	$0.5474 \pm 0.0121$	Muy irritante
	M4	$0.4488 \pm 0.0886$	Muy irritante
	M5	$0.4810 \pm 0.0516$	Muy irritante
	M6	$0.5119 \pm 0.0316$	Muy irritante

Crema de Sábila	M1	$0.3486 \pm 0.0003$	Muy irritante
	M2	$0.3477 \pm 0.0005$	Muy irritante
	M3	$0.3477 \pm 0.0051$	Muy irritante
	M4	$0.3476 \pm 0.0037$	Muy irritante
	M5	$0.3502 \pm 0.0028$	Muy irritante
	M6	$0.3481 \pm 0.0006$	Muy irritante
Crema Baba de Caracol	M1	$0.2888 \pm 0.0006$	Muy irritante
	M2	$0.3026 \pm 0.0003$	Muy irritante
	M3	$0.2991 \pm 0.0044$	Muy irritante
	M4	$0.3022 \pm 0.0039$	Muy irritante
	M5	$0.2913 \pm 0.0097$	Muy irritante
	M6	$0.3009 \pm 0.0015$	Muy irritante
Crema rosa mosqueta, baba de caracol y aloe vera	M1	$0.1023 \pm 0.0009$	Irritante Moderado
	M2	$0.1056 \pm 0.0026$	Irritante Moderado
	M3	$0.1055 \pm 0.0043$	Irritante Moderado
	M4	$0.1080 \pm 0.0048$	Irritante Moderado
	M5	$0.1108 \pm 0.0032$	Irritante Moderado
	M6	$0.1080 \pm 0.0009$	Irritante Moderado
Crema de aloe vera extracto	M1	$0.1121 \pm 0.0002$	Irritante Moderado
	M2	$0.1146 \pm 0.0025$	Irritante Moderado
	M3	$0.1148 \pm 0.0047$	Irritante Moderado
	M4	$0.1159 \pm 0.0038$	Irritante Moderado

de pepino	M5	0.1200 ± 0.0024	Irritante Moderado
	M6	0.1171 ± 0.0007	Irritante Moderado

**Tabla 24.** Datos Obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.

MUESTRAS SIN REGISTRO SANITARIO	Nº MUESTRA	Nº HUE VO	PESO DE MEMBRA NA (mg)	LONG DE ONDA (nm)	ABSOR BANCI A
Crema Portugal	M1	01	601.1	580	0.229
		02	600.1	580	0.249
		03	602.1	580	0.246
	M2	01	599.5	580	0.258
		02	600.2	580	0.248
		03	599.2	580	0.269
	M3	01	601.0	580	0.242
		02	605.2	580	0.255
		03	601.9	580	0.280
	M4	01	605.1	580	0.274
		02	604.2	580	0.281
		03	603.5	580	0.246
	M5	01	608.0	580	0.299
		02	591.9	580	0.273

		03	599.9	580	0.281
	M6	01	601.5	580	0.267
		02	603.7	580	0.257
		03	601.7	580	0.275
Crema Barbaría	M1	01	501.2	580	0.129
		02	502.2	580	0.127
		03	504.7	580	0.139
	M2	01	509.5	580	0.128
		02	500.2	580	0.128
		03	509.2	580	0.129
	M3	01	501.0	580	0.132
		02	505.2	580	0.125
		03	501.9	580	0.130
	M4	01	505.1	580	0.124
		02	504.2	580	0.131
		03	503.5	580	0.126
	M5	01	508.0	580	0.129
		02	501.9	580	0.133
		03	509.9	580	0.131
	M6	01	501.5	580	0.127
		02	503.7	580	0.137
		03	501.7	580	0.125

Crema Cicatricure	M1	01	645.1	580	0.347	
		02	642.2	580	0.349	
		03	646.5	580	0.346	
	M2	01	630.2	580	0.358	
		02	640.2	580	0.348	
		03	638.2	580	0.369	
	M3	01	641.0	580	0.342	
		02	634.2	580	0.355	
		03	632.9	580	0.380	
	M4	01	641.2	580	0.374	
		02	640.1	580	0.381	
		03	639.1	580	0.346	
	M5	01	641.0	580	0.399	
		02	635.0	580	0.373	
		03	637.1	580	0.381	
	M6	01	636.9	580	0.367	
		02	636.8	580	0.370	
		03	638.9	580	0.375	
	Crema Nívea	M1	01	558,2	580	0,147
			02	558,9	580	0,149
			03	558,1	580	0,146
		01	558,2	580	0,148	

	M2	02	559,1	580	0,148	
		03	557,4	580	0,149	
	M3	01	559,0	580	0,142	
		02	558,6	580	0,145	
		03	558,0	580	0,138	
	M4	01	559,1	580	0,144	
		02	557,9	580	0,141	
		03	557,8	580	0,146	
	M5	01	559,0	580	0,149	
		02	558,1	580	0,143	
		03	558,4	580	0,141	
	M6	01	558,9	580	0,137	
		02	559,4	580	0,147	
		03	557,5	580	0,145	
	Crema Pond's	M1	01	648,2	580	0,157
			02	658,9	580	0,159
			03	648,1	580	0,156
		M2	01	658,2	580	0,158
02			659,1	580	0,158	
03			657,4	580	0,159	
M3		01	649,0	580	0,162	
		02	658,6	580	0,165	

		03	658,0	580	0,158
	M4	01	659,1	580	0,154
		02	657,9	580	0,161
		03	657,8	580	0,166
	M5	01	659,0	580	0,159
		02	658,1	580	0,163
		03	658,4	580	0,161
	M6	01	658,9	580	0,157
		02	659,4	580	0,157
		03	657,5	580	0,155

**Tabla 25.** Resultados del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.

MUESTRA CON REGISTRO SANITARIO	Nº MUESTRA	Nº HUEVO	Concentración Colorante Moles/mg	CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Crema Portugal	M1	01	$1.0807 \times 10^{-8}$	0.0540	No irritante
		02	$1.1876 \times 10^{-8}$	0.0594	No irritante
		03	$1.1679 \times 10^{-8}$	0.0584	No irritante
	M2	01	$1.2361 \times 10^{-8}$	0.0618	No irritante
		02	$1.1821 \times 10^{-8}$	0.0591	No irritante
		03	$1.2946 \times 10^{-8}$	0.0647	No irritante

	M3	01	$1.1491 \times 10^{-8}$	0.0575	No irritante	
		02	$1.2088 \times 10^{-8}$	0.0604	No irritante	
		03	$1.3464 \times 10^{-8}$	0.0673	No irritante	
	M4	01	$1.308 \times 10^{-8}$	0.0654	No irritante	
		02	$1.3465 \times 10^{-8}$	0.0673	No irritante	
		03	$1.1652 \times 10^{-8}$	0.0583	No irritante	
	M5	01	$1.4315 \times 10^{-8}$	0.0716	No irritante	
		02	$1.3319 \times 10^{-8}$	0.0666	No irritante	
		03	$1.3562 \times 10^{-8}$	0.0678	No irritante	
	M6	01	$1.2792 \times 10^{-8}$	0.0640	No irritante	
		02	$1.2223 \times 10^{-8}$	0.0611	No irritante	
		03	$1.3207 \times 10^{-8}$	0.0660	No irritante	
Crema Barbaría	M1	01	$6.6692 \times 10^{-9}$	0.0333	No irritante	
		02	$6.5303 \times 10^{-9}$	0.0327	No irritante	
		03	$7.2477 \times 10^{-9}$	0.0362	No irritante	
	M2	01	$6.4986 \times 10^{-9}$	0.0325	No irritante	
		02	$6.6195 \times 10^{-9}$	0.0331	No irritante	
		03	$6.5644 \times 10^{-9}$	0.0328	No irritante	
	M3	01	$6.8606 \times 10^{-9}$	0.0343	No irritante	
		02	$6.3667 \times 10^{-9}$	0.0318	No irritante	
		03	$6.7227 \times 10^{-9}$	0.0336	No irritante	
			01	$6.3055 \times 10^{-9}$	0.0315	No irritante

	M4	02	$6.7546 \times 10^{-9}$	0.0338	No irritante
		03	$6.4508 \times 10^{-9}$	0.0323	No irritante
	M5	01	$6.5799 \times 10^{-9}$	0.0329	No irritante
		02	$6.9112 \times 10^{-9}$	0.0346	No irritante
		03	$6.6791 \times 10^{-9}$	0.0334	No irritante
	M6	01	$6.5394 \times 10^{-9}$	0.0327	No irritante
		02	$7.1369 \times 10^{-9}$	0.0357	No irritante
		03	$6.4111 \times 10^{-9}$	0.0321	No irritante
	Crema Cicatricure	M1	01	$1.5838 \times 10^{-8}$	0.0792
02			$1.6008 \times 10^{-8}$	0.0800	No irritante
03			$1.5755 \times 10^{-8}$	0.0788	No irritante
M2		01	$1.6763 \times 10^{-8}$	0.0838	No irritante
		02	$1.6008 \times 10^{-8}$	0.0800	No irritante
		03	$1.7096 \times 10^{-8}$	0.0855	No irritante
M3		01	$1.5693 \times 10^{-8}$	0.0785	No irritante
		02	$1.6508 \times 10^{-8}$	0.0825	No irritante
		03	$1.7787 \times 10^{-8}$	0.0889	No irritante
M4		01	$1.7262 \times 10^{-8}$	0.0863	No irritante
		02	$1.7636 \times 10^{-8}$	0.0882	No irritante
		03	$1.5937 \times 10^{-8}$	0.0797	No irritante
M5		01	$1.8497 \times 10^{-8}$	0.0925	No irritante
		02	$1.7381 \times 10^{-8}$	0.0869	No irritante

	M6	03	$1.772 \times 10^{-8}$	0.0886	No irritante
		01	$1.7032 \times 10^{-8}$	0.0852	No irritante
		02	$1.7183 \times 10^{-8}$	0.0859	No irritante
		03	$1.7373 \times 10^{-8}$	0.0869	No irritante
Crema Nívea	M1	01	$7,005 \times 10^{-9}$	0,0350	No irritante
		02	$7,1091 \times 10^{-9}$	0,0355	No irritante
		03	$6,9498 \times 10^{-9}$	0,0347	No irritante
	M2	01	$7,0615 \times 10^{-9}$	0,0353	No irritante
		02	$7,0501 \times 10^{-9}$	0,0353	No irritante
		03	$7,1282 \times 10^{-9}$	0,0356	No irritante
	M3	01	$6,7129 \times 10^{-9}$	0,0336	No irritante
		02	$6,8871 \times 10^{-9}$	0,0344	No irritante
		03	$6,4989 \times 10^{-9}$	0,0325	No irritante
	M4	01	$6,8245 \times 10^{-9}$	0,0341	No irritante
		02	$6,6696 \times 10^{-9}$	0,0333	No irritante
		03	$6,9535 \times 10^{-9}$	0,0348	No irritante
	M5	01	$7,1078 \times 10^{-9}$	0,0355	No irritante
		02	$6,7802 \times 10^{-9}$	0,0339	No irritante
		03	$6,6637 \times 10^{-9}$	0,0333	No irritante
	M6	01	$6,4320 \times 10^{-9}$	0,0322	No irritante
		02	$6,9900 \times 10^{-9}$	0,0349	No irritante
		03	$6,9007 \times 10^{-9}$	0,0345	No irritante

Crema Pond's	M1	01	$6,5189 \times 10^{-9}$	0,0326	No irritante
		02	$6,5087 \times 10^{-9}$	0,0325	No irritante
		03	$6,4712 \times 10^{-9}$	0,0324	No irritante
	M2	01	$6,4677 \times 10^{-9}$	0,0323	No irritante
		02	$6,4589 \times 10^{-9}$	0,0323	No irritante
		03	$6,5236 \times 10^{-9}$	0,0326	No irritante
	M3	01	$6,7538 \times 10^{-9}$	0,0338	No irritante
		02	$6,799 \times 10^{-9}$	0,0340	No irritante
		03	$6,4697 \times 10^{-9}$	0,0323	No irritante
	M4	01	$6,2675 \times 10^{-9}$	0,0313	No irritante
		02	$6,6145 \times 10^{-9}$	0,0331	No irritante
		03	$6,8552 \times 10^{-9}$	0,0343	No irritante
	M5	01	$6,5077 \times 10^{-9}$	0,0325	No irritante
		02	$6,7083 \times 10^{-9}$	0,0335	No irritante
		03	$6,6095 \times 10^{-9}$	0,0330	No irritante
	M6	01	$6,413 \times 10^{-9}$	0,0321	No irritante
		02	$6,4081 \times 10^{-9}$	0,0320	No irritante
		03	$6,3307 \times 10^{-9}$	0,0317	No irritante

**Tabla 26.** Resumen Resultados obtenidos del método CAM-TBS de las cremas para contorno de ojos con registro sanitario.

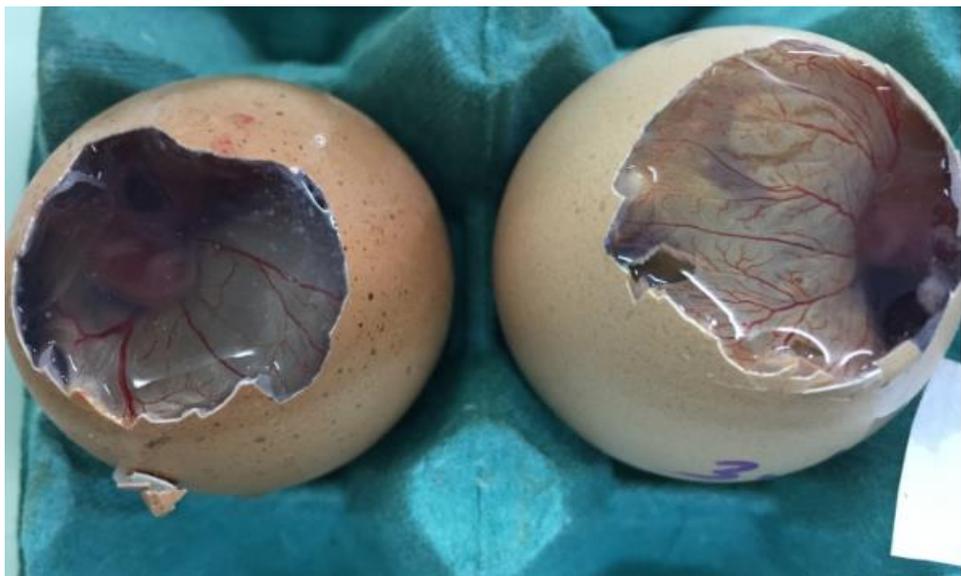
MUESTRAS CON REGISTRO SANITARIO	N° MUESTRA	PROMEDIO CANTIDAD DE COLORANTE	CLASIFICACIÓN
Crema Portugal	M1	$0.0573 \pm 0.0029$	No irritante
	M2	$0.0619 \pm 0.0028$	No irritante
	M3	$0.0617 \pm 0.0050$	No irritante
	M4	$0.0637 \pm 0.0047$	No irritante
	M5	$0.0687 \pm 0.0026$	No irritante
	M6	$0.0637 \pm 0.0025$	No irritante
Crema Barbaría	M1	$0.0341 \pm 0.0019$	No irritante
	M2	$0.0332 \pm 0.0003$	No irritante
	M3	$0.0332 \pm 0.0013$	No irritante
	M4	$0.0325 \pm 0.0012$	No irritante
	M5	$0.0336 \pm 0.0009$	No irritante
	M6	$0.0035 \pm 0.0019$	No irritante
Crema Cicatricure	M1	$0.0793 \pm 0.0006$	No irritante
	M2	$0.0831 \pm 0.0028$	No irritante
	M3	$0.0833 \pm 0.0052$	No irritante
	M4	$0.0847 \pm 0.0045$	No irritante
	M5	$0.0893 \pm 0.0029$	No irritante

	M6	$0.0860 \pm 0.0009$	No irritante
Crema Nívea	M1	$0.0351 \pm 0.0004$	No irritante
	M2	$0.0354 \pm 0.0002$	No irritante
	M3	$0.0335 \pm 0.0010$	No irritante
	M4	$0.0341 \pm 0.0008$	No irritante
	M5	$0.0342 \pm 0.0011$	No irritante
	M6	$0.0339 \pm 0.0015$	No irritante
Crema Pond's	M1	$0.0325 \pm 0.0001$	No irritante
	M2	$0.0324 \pm 0.0002$	No irritante
	M3	$0.0334 \pm 0.0009$	No irritante
	M4	$0.0329 \pm 0.0015$	No irritante
	M5	$0.0330 \pm 0.0005$	No irritante
	M6	$0.0319 \pm 0.0002$	No irritante

### ANEXO 3. Imágenes de la parte experimental



**Figura 15. Huevos fértiles de gallina criolla adquiridos en la parada, ala derecha Muestra los huevos limpios y desinfectados antes de encubar**



**Figura 16. Huevos con colorante azul de tripán, ambos de la crema Cicatricure, mostrando la absorción del colorante en el tejido de la membrana corioalantoidea.**



**Figura 17** Correcto lavado con agua destilada.

#### **ANEXO 4. Muestras de cremas sin registro sanitario**



**Figura 18.** Crema Concha de Nácar.



**Figura 19 .** Crema de Sábila.



**Figura 20.** Crema de Baba de caracol.



**Figura 21.** Crema Rosa Mosqueta, Baba de caracol y Aloe vera.



**Figura 22. Muestras de cremas sin registro.**

## ANEXO 5. MUESTRAS DE CREMAS CON REGISTRO SANITARIO



**Figura 23. Crema Cicatricure contorno de ojos.**



**Figura 24. Crema Portugal Q10 contorno de ojos.**



**Figura 25. Muestras de crema Babaria.**



**Figura 26. . Muestras de cremas Nivea.**

## ANEXO 6. Procedimiento experimental



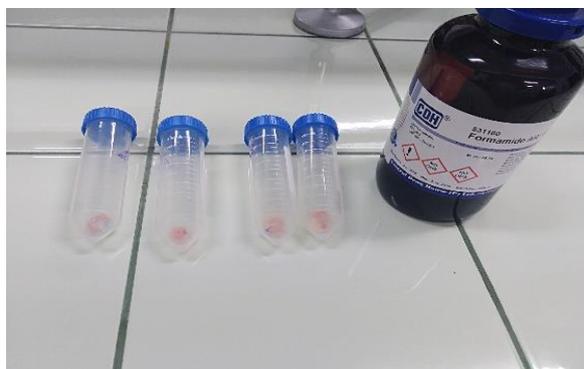
**Figura 27. Ensayo con la crema Portugal.**



**Figura 28. Ensayo con la crema Cicatricure.**



**Figura 29. Soluciones Preparadas al 2% de cada crema.**



**Figura 30. Imagen de la CAM en los tubos de propileno , al agregarle la formamida.**



**Figura 31. Pesado de la CAM.**



**Figura 32. Preparación de las Soluciones de las cremas contorno de ojos.**



**Figura 33. Preparación de soluciones de controles, con los debidos materiales de bioseguridad.**



**Figura 34. Autoras de la Tesis.**