

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

ENSAYOS TOXICOLÓGICOS ALTERNATIVOS EN EL CONTROL DE LA CALIDAD DE COSMÉTICOS.

Niurka Figueredo Castro,¹ Gastón García Simón,¹ Rebeca Fernández Gómez,² Mayttel de La Paz Luna.¹

RESUMEN

Las demandas crecientes del mercado, la formulación de nuevos productos, y las presiones de grupos ambientalistas y defensores de un trato humano para los animales han obligado al desarrollo de ensayos alternativos para la evaluación de la calidad de cosméticos y productos de higiene personal y colectiva. La capacidad de producir irritabilidad oftálmica de 10 productos examinados por el Departamento de Registro, Control y Calidad Sanitaria del INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos fue evaluada mediante el ensayo *in vitro* RBC de células rojas sanguíneas. El 90% de los productos evaluados fue calificado como irritante oftálmico en virtud de los resultados del ensayo *in vitro* RBC. Los resultados del ensayo *in vitro* RBC fueron coincidentes en un 100% con los obtenidos con el ensayo *in vivo* de Draize según el Protocolo OECD 405 de la Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo, y que constituye actualmente el método de referencia. El ensayo *in vitro* RBC de la irritabilidad oftálmica puede ser una alternativa útil y segura en la evaluación toxicológica de los cosméticos y productos de higiene personal y colectiva. **Figueredo Castro N, García Simón G, Fernández Gómez R, De la Paz Luna M. Ensayos toxicológicos alternativos en el control de la calidad de cosméticos. RCAN Rev Cubana Aliment 2009;19(2):183-193. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.**

Descriptor DeCS: COSMÉTICOS / CONTROL DE LA CALIDAD / ENSAYOS TOXICOLÓGICOS ALTERNATIVOS / TOXICOLOGÍA IN VITRO / IRRITACIÓN OCULAR / MÉTODOS ALTERNATIVOS.

¹ Máster en Ciencias.

² Doctora en Medicina. Especialista primer grado en Higiene y Epidemiología.

Recibido: 25 de Julio del 2009. Aprobado: 27 de Enero del 2010.

Niurka Figueredo Castro. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta 1158 e/t Llinás y Clavel.

Centro Habana. La Habana. Cuba.

Correo electrónico: rebeca.fernandez@infomed.sld.cu

INTRODUCCION

El uso de cosméticos para realzar la belleza, enmascarar la fealdad, y contribuir a la higiene general del cuerpo, se ha difundido ampliamente desde los mismos albores de la humanidad. Sin embargo, el uso de cosméticos podría resultar en reacciones adversas de consecuencias imprevisibles.¹⁻² Es por tal motivo que desde el pasado Siglo XX se han desarrollado sistemas de control de la calidad de estos productos, en aras de lograr una mayor seguridad de su uso.

Los productos cosméticos tienen una presencia importante con nuestras vidas. El incremento en la variedad de productos y el volumen de los mismos, orientado a la satisfacción de una demanda cada vez mayor y más especializada, y las posibles repercusiones que nuevas formulaciones puedan tener para la salud humana, obligan al establecimiento y evaluación de los riesgos inherentes en el uso de cosméticos, y la verificación continua de la calidad sanitaria y comercial mediante técnicas de control de la calidad y análisis toxicológico.²

Las formulaciones cosméticas corrientes, derivadas de la investigación y desarrollo de nuevos ingredientes, y obtenidas gracias a nuevos procedimientos tecnológicos de obtención, purificación y fabricación, han obligado a modificar regularmente las legislaciones existentes sobre la inocuidad y seguridad para el uso de cosméticos. El mejor conocimiento del perfil toxicológico de los cosméticos consumidos actualmente conduce a continuas modificaciones de los cuerpos legislativos vigentes en estos asuntos con el fin último de introducir/excluir sustancias de las guías autorizadas de producción tecnológica.²

Los ensayos toxicológicos *in vivo* se han empleado históricamente en la evaluación de la inocuidad y seguridad de los ingredientes de cosméticos.²⁻⁵ Sin

embargo, en años recientes se ha criticado el empleo de tales ensayos debido a los costos incrementados de ejecución, junto al cuestionamiento cada vez mayor de los grupos de defensa de conductas éticas y ambientalistas en la industria cosmética. En respuesta a este escenario, se han dedicado esfuerzos y recursos a la búsqueda de ensayos toxicológicos alternativos basados en análisis *in vitro*. Es por ello que han surgido métodos alternativos de evaluación siguiendo el principio de las 3 ERRES: Refinar, Reducir y/o Reemplazar el empleo de los animales de experimentación para la evaluación sanitaria de productos cosméticos.³⁻¹⁰ El ensayo HET-CAM de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina y el ensayo RBC de determinación de la irritabilidad oftálmica mediante el uso de eritrocitos han sido algunos de los propuestos para responder a las exigencias antes mencionadas.³⁻¹⁴

El Departamento de Registro, Control y Calidad Sanitaria del INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, adscrito al MINSAP Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba, es el encargado de establecer los requisitos y regulaciones necesarias para la aprobación y venta autorizada en el país de cosméticos y otros productos de belleza, junto con artículos de higiene general. El Departamento hace posible la caracterización higiénica-sanitaria y toxicológica de todos estos productos, y su clasificación de acuerdo al riesgo que los mismos representan para la salud.¹⁵⁻¹⁸

Interpretando las tendencias globales actuales, el Departamento ha introducido ensayos toxicológicos alternativos *in vitro* para la caracterización de la inocuidad y seguridad de cosméticos y productos de higiene general. En este trabajo se presentan los resultados del empleo de sendos protocolos para la determinación de la irritabilidad oftálmica de productos

cosméticos colocados ante el Departamento para la evaluación toxicológica. La irritabilidad oftálmica del producto en cuestión fue determinada indistintamente *in vivo* mediante el ensayo de Draize luego de la instilación de la sustancia problema en la cámara anterior del ojo de conejos de experimentación, e *in vitro* después del uso de eritrocitos de ratas, respectivamente. El objetivo del trabajo fue evaluar la comparabilidad de los resultados obtenidos con ambos ensayos.

MATERIAL Y METODO

Ensayo *in vivo* de irritabilidad oftálmica: También referido como el ensayo de Draize en este trabajo, fue conducido según el protocolo número 405 de la OECD Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico.¹⁹ Los resultados del ensayo de Draize se evaluaron según la escala descrita previamente.¹⁹⁻²⁰ El ensayo se realizó con conejos albinos, de ojos rojos, de la línea F1 procedentes del CENPALAB Centro de Producción de Animales de Laboratorio (La Habana, Cuba), y que tenían una masa corporal entre 1.8 – 2.0 Kg. Los conejos se mantuvieron durante el ensayo en jaulas individuales, debidamente identificadas, en un local con temperatura y humedad controladas, y ciclo luz-oscuridad 12 horas x 12 horas. Los animales se alimentaron con pienso formulado especialmente y agua *ad libitum*.

Los ojos del conejo de experimentación se inspeccionaron rigurosamente 24 horas antes del ensayo. Se anotaron las características del segmento anterior del ojo: córnea, conjuntiva e iris.

En el día del ensayo la sustancia de prueba fue instilada en el fondo del saco conjuntival del ojo derecho del animal en un volumen de 0.1 mL, o 0.1 g, según correspondiera. Hecho esto, los párpados del ojo derecho se cerraron y se mantuvieron

unidos durante 15 segundos para garantizar la distribución homogénea de la sustancia de prueba por toda la mucosa ocular. El ojo izquierdo se tomó como control, y en virtud de ello, no recibió tratamiento alguno.¹⁹⁻²⁰ Se utilizaron tres conejos para cada lote ensayado del producto.

Los ojos del animal se examinaron a intervalos de 1, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación del producto, con ayuda de una fuente de luz blanca y una lupa de aumento. Se registraron la presencia de eritema, edema, secreciones, y lesiones del iris (Anexo A). La córnea se tiñó con fluoresceína sódica al 2%, y se inspeccionó con lámpara ultravioleta. El tamaño y la extensión de las lesiones presentes de la córnea se registraron en los formularios habilitados al efecto (Anexo A). Las lesiones oculares se graduaron de acuerdo a lo reflejado en el Anexo B. El índice de irritabilidad ocular, para conocer la clasificación del producto, se estratificó como se muestra en la Tabla 1.

Ensayo *in vitro* de irritabilidad oftálmica: La irritabilidad oftálmica de los cosméticos y productos de higiene general ensayados se determinó *in vitro* mediante la observación de la hemólisis de eritrocitos de ratas albinas Wistar.^{6, 10, 21-22} El protocolo del ensayo *in vitro* se adaptó de otro descrito previamente usando sangre de ternero.¹³ Se emplearon ratas albinas Wistar con un peso de 200 – 220 g. La sangre se extrajo del plexo ocular mediante la introducción de un tubo capilar en el ángulo interno del ojo, previa anestesia del animal en atmósfera de éter. La sangre se colectó en tubos de ensayo a los que se le había añadido 1 mL de solución tampón citrato. En cada tubo se dispensaron 9 mL de sangre del animal, para una proporción 1:10, y la mezcla resultante se homogeneizó mediante agitación suave. Los eritrocitos se obtuvieron después de centrifugación durante 15 minutos a 4,261 rpm a la temperatura del cuarto de trabajo

(22 ± 2 °C), y decantación del plasma formado. Los eritrocitos se lavaron 4 veces consecutivas con solución PBS tampón fosfato salino (pH 7.4). La preparación de eritrocitos se desechó si, al final de cualquiera de los lavados, apareció en el sobrenadante una tonalidad entre rosada y rojiza, indicativa de hemólisis. Los paquetes de eritrocitos lavados se conservaron a 4 °C hasta el día del ensayo.

Tabla 1. Escala de evaluación de la irritación ocular observada en el ensayo *in vivo* de Draize. "X" representa el puntaje obtenido del promedio de los resultados observados en el ojo derecho de los 3 animales ensayados. Para más detalles: Consulte el Anexo B.

NI: No Irritante	$0 \leq X < 10$
LI: Ligeramente irritante	$10 \leq X < 20$
MI: Moderadamente irritante	$20 \leq X < 30$
IS: Irritante severo	$30 \leq X \leq 100$

En el día del ensayo, la sustancia de prueba se preparó como una solución al 0.1% respecto del Sodio-Lauril-Sulfato empleado como surfactante para una mejor solubilización. De la solución al 0.1% de la sustancia de prueba se pipetearon en viales con tapa los volúmenes siguientes: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, y 80 μL . Cada vial se rellenó con 975 μL de tampón PBS. Rápidamente se dispensaron en cada vial 25 μL de la suspensión de eritrocitos lavados ($\sim 8 \times 10^9$ células/mL). La mezcla se agitó, y se incubó durante 10 minutos, a la temperatura del cuarto de trabajo. Terminado el tiempo de incubación, los viales de reacción se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min, para remover las células intactas y los desechos del medio de reacción. El sobrenadante resultante se decantó en cubetas de 1 cm, y la absorbancia se midió a 560 nm contra un blanco que contenía la muestra diluida solamente en tampón PBS. La hemólisis espontánea se monitoreó de la misma manera después de

añadir 25 μL de eritrocitos a 975 μL de agua, para un 100% de hemólisis.

Se prepararon varias concentraciones de la sustancia de prueba en viales con tapa de 1.5 mL de capacidad mediante diluciones apropiadas con tampón PBS. Se trató de que la relación Dosis-Respuesta se extendiera desde el No-efecto (Concentración cero) hasta el 100% de hemólisis (Concentración máxima). La absorbancia neta para cada concentración de la sustancia de prueba se ploteó en papel milimetrado. Se trazó la recta de mejor ajuste mediante el método de los mínimos cuadrados. La concentración H_{50} de la sustancia de prueba que causó el 50% de la hemólisis de los eritrocitos lavados se interpoló de la recta así construida.

La concentración H_{50} de la sustancia de prueba se corrigió para el efecto desnaturador de proteínas. Brevemente, la sustancia de prueba se preparó al 1% por dilución en tampón PBS. En un vial con tapa Eppendorf[®] (Alemania) se pipetearon 100 μL de la solución al 1% de la sustancia de prueba, 875 μL de tampón PBS, y 25 μL de eritrocitos lavados, para un volumen final de 1 mL. El vial se incubó durante 10 min a la temperatura del cuarto con agitación constante. Finalizada la incubación, la mezcla de reacción se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min, y se colectó el sobrenadante resultante. La absorbancia del sobrenadante a 540 y 575 nm, respectivamente, se midió contra 1 mL de tampón PBS, en cubetas de 1 cm de paso de luz. El ID Índice de Desnaturalización de la sustancia de prueba se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ID = 100 * \frac{(R_1 - R_i)}{(R_1 - R_2)} \quad (1)$$

Siendo R_1 : constante = 1.05 ± 0.01 ; R_2 : relación entre la absorbancia a 575 y 540 nm del surfactante empleado en el ensayo; y R_i :

la relación entre la absorbancia a 575 y 540 nm de la sustancia de prueba.

El II Índice de Irritación de la sustancia de prueba se obtuvo como la relación entre la concentración H₅₀ y el ID:

$$II = \frac{H_{50}}{ID} \quad (2)$$

Los valores obtenidos del II se categorizaron tal y como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Escala de evaluación del II Índice de Irritación Ocular observado en la hemólisis *in vitro* de hematíes de ratas.

Irritación ocular	Índice II
NI: No Irritante	> 100
LI: Ligeramente Irritante	> 10
MI: Moderadamente Irritante	> 1
I: Irritante	> 0.1
EI: Extremadamente Irritante	< 0.1

Sustancias de prueba ensayadas: Se ensayaron 10 cosméticos y productos de higiene general mediante los métodos descritos anteriormente. Cada sustancia de prueba estaba acompañada de los correspondientes certificados químico y microbiológico de calidad emitidos por la fábrica, y la Licencia Sanitaria del establecimiento productor. Las sustancias ensayadas fueron las siguientes: Detergente de lavandería, Gel de manos, Detergente multiuso, Champú tropical "Sábila", Champú tropical "Fresa", Champú tropical "Miel", Desinfectante de piso, Champú "Fiesta", Gel de baño infantil, y Suavizante de ropa.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico-matemático de los resultados: Las sustancias de prueba ensayadas, la información técnica acompañante, y los resultados obtenidos de los ensayos de irritabilidad oftálmica se almacenaron en un contenedor digital creado

en EXCEL© 7.0 para Windows© (Microsoft, Redmond, Virginia, Estados Unidos). La comparabilidad de los resultados de ambos ensayos se evaluó mediante el test de McNemar para muestras apareadas.²³ Se fijó un nivel del 5% para denotar el resultado como estadísticamente significativo.²³

RESULTADOS

La Tabla 3 muestra los resultados de la conducción de los protocolos de ensayos de la irritabilidad oftálmica descritos en este trabajo. El 90% de los productos ensayados demostraron ser irritantes mediante el ensayo *in vivo* de Draize. Asimismo, el completamiento del ensayo *in vitro* RBC resultó en una proporción igual de las sustancias ensayadas con capacidad para producir irritabilidad oftálmica. Las coincidencias entre la irritabilidad oftálmica observada tanto *in vivo* como *in vitro* fueron del 100%. La Figura 1 muestra la correspondencia de los resultados obtenidos con los ensayos en comparación.

DISCUSION

El ensayo *in vitro* RBC de la irritabilidad oftálmica determinado de la hemólisis de hematíes de ratas devolvió resultados idénticos respecto del ensayo *in vivo* de Draize, lo que confirma que se puede convertir en una alternativa útil y segura en la actividad del control de la calidad de los cosméticos. Los resultados de la aplicación del ensayo *in vitro* de la irritabilidad oftálmica observados en este trabajo confirman los documentados en una publicación anterior luego de la evaluación de 7 productos cosméticos.²² El ensayo *in vitro* también se destaca por la rapidez del completamiento del protocolo experimental, la sencillez metodológica, y la economía de recursos.

Tabla 3. Resultados de la conducción de los ensayos de irritabilidad oftálmica. "II" se refiere al Índice de Irritación oftálmica. Para más detalles: Consulte el texto de este artículo.

Producto	Ensayo <i>in vivo</i>		Ensayo <i>in vitro</i>	
	II	Clasificación	II	Clasificación
Detergente multiuso	86.7	IS	0.35	I
Detergente de lavandería	34.2	IS	0.69	I
Champú Tropical "Miel"	93.5	IS	0.45	I
Champú Tropical "Fresa"	86.5	IS	0.79	I
Champú Tropical "Sábila"	94.5	IS	0.93	I
Desinfectante de piso	31.8	IS	0.19	I
Champú "Fiesta"	49.3	IS	0.54	I
Gel de manos	83.9	IS	0.82	I
Gel de baño infantil	50.2	IS	0.50	I
Suavizante de ropa	13.3	LI	44.4	LI

No obstante los resultados observados a la conclusión de este trabajo, debe hacerse notar que, aunque los productos clasificaron como irritantes oftálmicos severos, ello no quiere decir que deba ser limitados en su uso. La función como cosméticos y productos de higiene personal de las sustancias ensayadas no implica la instilación directa de los mismos en la conjuntiva ocular. Luego, las agencias reguladoras alertan al consumidor sobre el modo de uso del producto en cuestión, la capacidad del mismo para causar irritación ocular, las acciones a realizar en caso de que ello ocurra, y la colocación de las advertencias necesarias en la etiqueta del producto.

El ensayo *in vitro* RBC descrito puede ser útil también en la evaluación preliminar del potencial irritante ocular producido tanto por tensioactivos, como formulaciones que los contengan. Sin embargo, la utilidad del ensayo *in vitro* puede verse limitada en situaciones en las que los productos a ensayar no contengan surfactantes.²⁴

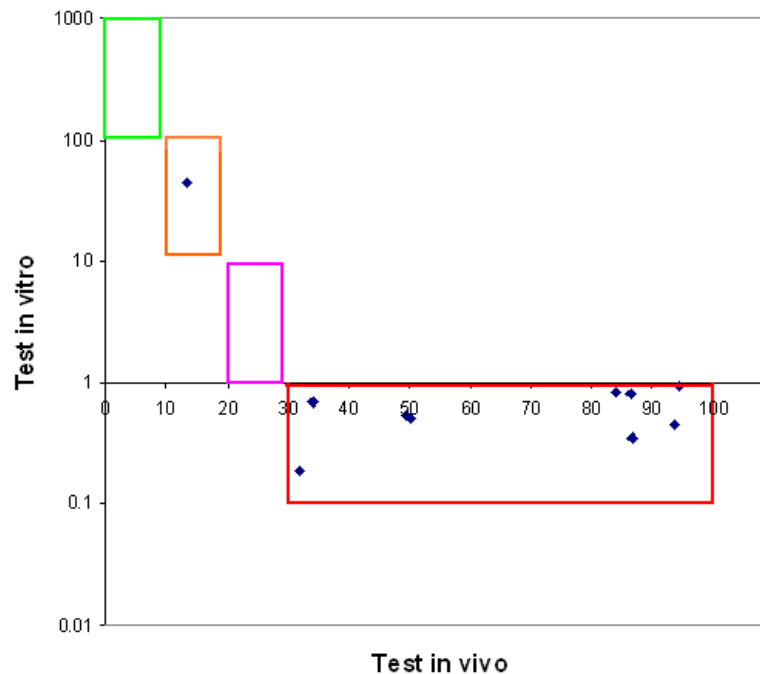
El ensayo *in vitro* RBC de la irritabilidad oftálmica se concibe como un método de tamizaje antes de la conducción de ensayos *in vivo*. Esto es, el analista puede diferir (e incluso anular) la realización del ensayo *in vivo* de Draize en caso de que el

test *in vitro* demuestre la irritabilidad oftálmica del producto problema. Por el contrario, en caso de un resultado negativo del ensayo *in vitro*, la irritabilidad oftálmica del producto debe establecerse mediante la conducción de un ensayo *in vivo*.

CONCLUSIONES

El ensayo *in vitro* RBC de irritación ocular empleando hemáties de ratas mostró un comportamiento coincidente con el propio del protocolo OECD 405, que mide *in vivo* la capacidad de cosméticos y productos de higiene personal y colectiva de causar irritación del ojo del animal de experimentación, y que es actualmente tenido como método de referencia. Por consiguiente, el ensayo *in vitro* puede sustituir al protocolo *in vivo* en la evaluación toxicológica de productos capaces de causar irritación oftálmica debido a la presencia de agentes tensioactivos. La conducción del protocolo *in vivo* se reservaría para aquellos casos en los que el ensayo *in vivo* devuelva resultados negativos.

Figura 1. Correspondencia entre los resultados obtenidos en las sustancias de prueba por los métodos en comparación.



Leyenda:

- | | |
|---|---|
| No Irritante | Moderadamente Irritante |
| Ligeramente Irritante | Irritante Severo |

SUMMARY

Growing market demands, formulation of new products, and increasing pressures from environmentalist groups and defenders of a humane treatment for animals have forced the development of alternative assays for quality assessment of cosmetics and collective as well as personal hygiene products. Ophthalmic irritating capability of 10 products assessed by the Department of Registry, Control and Sanitary Quality of the Food Hygiene and Nutrition Institute was evaluated by means of the RBC in vitro assay using red blood cells. Ninety percent of the evaluated products was qualified as ophthalmic irritant given the results of the in vitro assay. The results of the RBC in vitro assay were 100% coincident with those obtained with the Draize in vivo assay conducted according with the CDEO 405

Protocol of the Cooperation and Development European Organization, and which is the current reference method. The RBC in vitro ophthalmic irritation assay can be considered a safe and useful alternative for the toxicological assessment of cosmetics and collective as well as personal hygiene products. **Figueredo Castro N, García Simón G, Fernández Gómez R, De la Paz Luna M.** Quality control of cosmetics by means of current and alternative toxicological assays. *RCAN Rev Cubana Aliment* 2009;19(2):183-193. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Keywords: Cosmetics / Quality Control / Alternative toxicological assays / In Vitro Toxicology / Eye irritation / Alternative methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. NC 132:2001. Perfumería y cosméticos. Requisitos sanitarios generales. Comité Estatal de Normalización. Cuba.
2. Reglamentación de Cosméticos [Texto refundido]. Monografía de divulgación No. 13: 11,19,22-23,25. Dirección General de Farmacia y productos sanitarios. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid: 2003.
3. García Simón G. Proyecto del Grupo ETAC de Trabajo de Estudios de Toxicología Alternativa en Cuba. Ponencia presentada en el Primer Taller Nacional de Toxicología Alternativa. La Habana: 1996.
4. HET-CAM. Método alternativo al test de Draize para la determinación del potencial irritante oftálmico. CIDEM Centro de Desarrollo de Medicamentos. La Habana: 1997.
5. De la Paz Luna M. Utilización de los métodos alternativos HET-CAM y Artemia salina leach en la evaluación de productos cosméticos y extractos naturales. Trabajo de Diploma. IFAL Instituto de Farmacia y Alimentos. Departamento de Registro, Control y Calidad Sanitaria. INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana: 1998.
6. García G, Palacios M, Gazapo R, Pérez L. Elaboración de una metodología para la evaluación de la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. Rev Cubana Farm 1988;22: 5-24.
7. Johnston NE, Rusche B. Ethics committees: how do they contribute to the Three Rs? En: Animal alternatives, welfare and ethics. Synopsis of a workshop (Editores: Van Zutphen LFM, Balls M). Developments in animal and veterinary Sciences. Elsevier. Londres: 1997. pp 391-5.
8. Fentener M, van Vlissinger JM, de Greeve P, Verhoog H. The re-use of animal in research: legal, ethics, scientific and managerial aspects. *Ibidem*. pp 263-5.
9. Repetto G, Repetto M. Métodos alternativos: Estudios toxicológicos in vitro. En: Toxicología especial (Editor: Repetto M). Díaz de Santos. Madrid: 1995. pp 37-59.
10. Murillo Jorge G, Pérez Marqués LU, Tur Naranjo E. Incorporación de dos ensayos alternativos para evaluar irritación ocular en un laboratorio de toxicología. Rev Cubana Farm 2004;38(3):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000300003&lng=es. Fecha de última visita: 28 de Mayo del 2009.
11. Freeberg FE, Griffith JF, Bruce RD, Bay PHS. Correlation of animal test methods with human experience for household products. J Toxicol Cutaneous Ocular Toxicol 1984;1:53-64.
12. Draize JH, Woodward G, Calvery HP. Methods for the study of irritation and toxicology of substances applied topically to the skin and mucous membrane. J Pharm Exp Therapy 1944; 82:377-90.
13. González González Madariaga Y, Castillo Alfonso O, Sánchez Álvarez C, Molina Martínez JL, Pizarro Espín A, Silveira Prado EA. Evaluación de la irritabilidad oftálmica de cremas cosméticas mediante un método in vitro en sustitución de la prueba de conejos. Revista REDVET Electrónica de Veterinaria 2006;7:1-7. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030306/030606.pdf>. Fecha de última visita: 11 de Julio del 2008.

14. Balls M. The Three Rs concept of alternatives to animal experimentation. En: Animal alternatives, welfare and ethics. Synopsis of a workshop (Editores: Van Zutphen LFM, Balls M). Developments in animal and veterinary Sciences. Elsevier. Londres: 1997. pp 27-41.
15. Ley 41 de la Salud Pública de Julio del 1983. Gaceta Oficial de la República. Consejo de Estado. República de Cuba.
16. Decreto Ley Número 54. Disposiciones Sanitarias Básicas. Abril del 1982. Consejo de Estado. República de Cuba.
17. Resolución Número 32 de 1996. Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba.
18. Ley 64 sobre el Registro Sanitario del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Abril del 1997. Ministerio de Salud Pública. República de Cuba.
19. OECD 1987. Guidelines for testing of chemicals. Acute eye/corrosion. Publication Number 405. Adoptadas el 24 de Febrero de 1987.
20. ECETOC Technical report number 48. Eye irritation: Reference Data Bank. Second Edition. Brussels: 1998. pp 266.
21. INVITTOX Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology. Protocol number 37. Red Blood Cell. Brussels: 1992.
22. Martínez Pacheco M, Guevara Orellanes I, García Simón G, Valdivieso García A. Ensayo alternativo de irritabilidad ocular a través del método de las células rojas sanguíneas (RBC) en diferentes productos. Revista de Toxicología 2003:2003. Disponible en: <http://www.sertox.com.ar/retel/n07/03.pdf>. Fecha de última visita: 28 de Mayo del 2009.
23. Martínez Canalejo H, Santana Porbén S. Manual de Procedimientos bioestadísticos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana: 1990.
24. Pape WJW, Pfanenbecker 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 1987; 1:525-36.

ANEXOS

Anexo A. Formulario de recogida de datos para el ensayo *in vivo* de irritabilidad oftálmica según Draize.

OBSERVACIONES																	
No. Animal	Ojo	Eritema				Edema				Secreciones				Iris		Córnea	Puntaje
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2		
1	OD																
	OI																
2	OD																
	OI																
3	OD																
	OI																

Anexo B. Escala de clasificación para la evaluación de la irritación ocular en el ensayo *in vivo* de Draize.

CORNEA	GRADUACION
A. Opacidad y grado de densidad (Se toman para la lectura las áreas más densas):	
• Áreas dispersas, difusas. Detalles del iris claramente visibles.	1
• Áreas traslúcidas. Detalles del iris ligeramente oscurecidos.	2
• Áreas opalescentes detalles del iris no visibles. Tamaño de la pupila escasamente discernible.	3
• Áreas opacas. Iris invisible.	4
B. Áreas de la córnea involucradas:	
• $0 \leq X \leq \frac{1}{4}$	1
• $\frac{1}{4} \leq X \leq \frac{1}{2}$	2
• $\frac{1}{2} \leq X \leq \frac{3}{4}$	3
• $\frac{3}{4} \leq X \leq 1$	4
Para la evaluación se resolverá $A \times B \times 5 =$	
Máximo valor posible = 80	
IRIS	
A. Pliegues y reacción ante la luz:	
• Pliegues sobre lo normal. Congestión, inflamación, inyección circuncorneal (uno de ellos, todos o cualquier combinación). El iris aún reacciona a la luz. Una reacción retardada es positiva.	1
• No reacciona a la luz, hemorragia, destrucción gruesa (uno de ellos o todos estos).	2
Para la evaluación se resolverá $A \times 5 =$	
Máximo valor posible = 10	
CONJUNTIVA	
A. Enrojecimiento:	
• Vasos definidamente inyectados sobre lo normal.	1
• Difuso rojo carmesí. Vasos individuales fácilmente discernibles.	2
• Rojo difuso.	3
B. Quemosis	
• Cualquier inflamación sobre lo normal (incluye la membrana nictitante).	1
• Inflamación obvia con eversión parcial de los párpados.	2
• Inflamación con los párpados aproximadamente cerrados hasta la mitad.	3
• Inflamación con los párpados de la mitad a completamente cerrados.	4
C. Secreciones	
• Cualquier cantidad fuera de lo normal	1
• Secreciones con humidificación de los párpados	2
• Secreciones con los párpados y considerables áreas adyacentes a él humidificadas	3
Para la evaluación se resolverá $(A + B + C) \times 2 =$	
Máximo valor posible = 20	
Valor máximo total de la prueba: Sumatoria de los valores individuales de las secciones (Córnea + Iris + Conjuntiva) =	
Máximo valor posible = 110	