

UNIDAD DE ENSAYOS TOXICO-BIOLÓGICOS

ENSAYO DE IRRITACION DERMICA
***IN VITRO* METODO DERMAL IRRITECTION**

(SKINTEX)

Empresa: DIET-ESTHETIC

Prod./Muestra: AMPOLLA FLASH

Lote/Referencia: DIET

Nº Petición: F00770812

Versión: V.01

CONFIDENCIAL

1.- INDICE

ENSAYO DE IRRITACION DERMICA *IN VITRO* METODO IRRITECTION DERMAL
(SKINTEX)

1.- INDICE

2.- METODO

3.- RESUMEN DEL METODO

4.- MUESTRA OBJETO DEL ESTUDIO

5.- CONDICIONES AMBIENTALES

6.- MATERIAL

7.- PREPARACION DE LA MUESTRA

8.- ENSAYO

9.- PARAMETROS ESTUDIADOS Y CRITERIOS DE VALORACION

10.- BIBLIOGRAFIA

11.- RESULTADO

12.- CONCLUSIONES

2.- METODO

El método empleado en el ensayo, es el descrito en el manual de instrucciones de esta técnica, proporcionado por IN VITRO INTERNATIONAL: "IRRITECTION™ ASSAY SYSTEM Instruction Manual".

Dado que la muestra, es un producto de tipo cosmético, se ha utilizado el kit de reactivo *dermal cosmetics*.

3.- RESUMEN DEL METODO

IRRITECTION ASSAY SYSTEM DERMAL RESPONSE (SKINTEX)

Es un test *in vitro*, estandarizado y objetivo, que determina el potencial de irritación cutánea de distintos productos.

El método se basa en aplicar la muestra problema sobre una membrana, compuesta de colágeno, queratina y colorante, que está en contacto con un reactivo proteico. Los productos irritantes al contactar con esta membrana pueden alterarla, con liberación del colorante, y/o atravesar la membrana y reaccionar con el reactivo provocando distintos grados de precipitación, en función de la capacidad irritante de la muestra. Esta precipitación se detecta en forma de opacidad que se valora con un espectrofotómetro, que conectado a un ordenador y mediante el programa correspondiente, realiza los cálculos y permite la obtención de resultados.

4.- MUESTRA OBJETO DEL ESTUDIO

Muestra: AMPOLLA FLASH

Lote/Referencia: DIET

Nº de petición: F00770812

5.- CONDICIONES AMBIENTALES

Durante el ensayo, las condiciones ambientales del laboratorio fueron las siguientes:

Temperatura: 21°C (\pm 2°C).

Humedad Relativa: 55% (\pm 25%).

Aire: 15 renovaciones de aire por hora y prefiltrado a 5 μ m.

6.- MATERIAL

- Kit IRRITECTION de In Vitro International, que contiene: Dermal Reagent Powder, Dermal Hydrating Solution, Dermal Blanking buffer, Dermal Inhibition Check, Dermal Activator, 4 soluciones calibradoras CAL0, CAL1, CAL2 y CAL3, 2 soluciones de control de calidad QC1 y QC2, placa de 24 pozos, discos de membrana (26 rojos y 22 blancos), palillos agitadores de madera, papel filtro Watman, certificado del lote Range Specification data sheet.
- Tejido de papel
- Pipeta automática Finnpiquette P.C.R. y pipetas de volumen variable.
- Puntas de pipeta desechables
- Pinzas de plástico
- Repetidor "Eppendorf Repeater TM U780"
- 3 vasos precipitados de 100 mL
- 1 probeta de 50 mL
- Embudo
- Rotulador para escribir sobre plástico
- pHmetro Portable 506 o tiras de papel indicador de pH
- Lector de placas E-max de Molecular Devices.
- Programa Irritection Software para Windows.
- Incubador ISUZU
- Parafilm o plástico envolvente.
- Guantes de vinilo o de látex de un solo uso.

7.- PREPARACION DE LA MUESTRA

Se testan 4 volúmenes: 50 μ L, 75 μ L, 100 μ L y 125 μ L

8.- ENSAYO

El ensayo Dermal Irritection es un test *in vitro* cuantitativo estandarizado, empleado para predecir el potencial de irritación dérmica de productos cosméticos, farmacéuticos, materias primas etc. con $\text{pH} \leq 9.0$. El ensayo se basa en el hecho de que los productos que producen irritación dérmica, provocan alteraciones en la estructura de la queratina, colágeno y otras proteínas dérmicas. Dermal Irritection Assay imita estos fenómenos bioquímicos, el ensayo se basa en dos componentes:

- Membrana semipermeable, que contiene una mezcla de Queratina, Colágeno y un colorante indicador.
- Solución reactivo consistente en una matriz macromolecular de proteínas (globulinas) y glicoproteínas.

Se ponen en contacto distintas cantidades de muestra con la membrana que está sumergida en la solución reactivo durante 24 horas, a 25°C de temperatura, de tal manera que podrá traspasarla y entrar en contacto con la matriz proteica de la solución reactivo.

La reacción entre la muestra y las proteínas del reactivo provoca cambios conformacionales en las mismas, lo cual se detecta en forma de incremento de turbidez que se valora espectrofotométricamente, además si durante el paso de la muestra a través de la membrana se ha producido una alteración de su composición, ésta se detectará porque se habrá liberado el colorante indicador lo, cual también se determinará espectrofotométricamente. Estas valoraciones se realizan midiendo la densidad óptica (D.O.) del reactivo a 450 nm.

A la vez que se aplica la muestra sobre una membrana en contacto con la solución reactivo, se dispensa la misma cantidad de muestra en otra membrana en contacto con la solución Blanco (sin matriz proteica) que servirá de control y cuyos valores de densidad óptica a 450 nm se restarán de los obtenidos en la solución reactivo.

Se prepara una curva estándar con 4 sustancias calibradas, de las que se conoce el potencial de irritación dérmica *in vivo*. La comparación entre las medidas de densidad óptica de la muestra y las producidas por los estándar, permite el cálculo del HIE (Human Irritancy Equivalent) a partir del cual se clasifica el potencial irritante de la muestra, según la tabla del apartado 9.- (ver página 9).

El análisis de los datos y el cálculo del HIE se realiza a través del programa informático conectado al lector.

Se testan también 2 soluciones de control de calidad, proporcionadas con cada Kit, para asegurar que el ensayo se ha realizado correctamente, puesto que como mínimo en uno de los dos controles, el resultado tiene que corresponderse con las especificaciones descritas en el protocolo interno; es el programa informático quien calcula e informa de si los controles son o no correctos y por tanto si el ensayo puede o no considerarse como correcto, es decir CALIFICADO o NO CALIFICADO.

Para eliminar la posibilidad de falsos negativos, se realiza un test de inhibición, que no es más que un control positivo, que nos confirma que cualquier valor de D.O. muy bajo, es real y no debido a cualquier efecto inhibitorio de la reacción que pueda provocar la muestra testada.

9.- CRITERIOS DE VALORACION

Human Irritancy Equivalent (HIE) score (Indice Equivalente Irritación Humana)	Clasificación
0.00 - 0.90	NO IRRITANTE
> 0.90 - 1.20	NO IRRITANTE / IRRITANTE
> 1.20 - 5.00	IRRITANTE

10.-BIBLIOGRAFIA

(1).- JOHM W. DRAIZE y otros. Methods for the Study of irritatiom and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 1944.

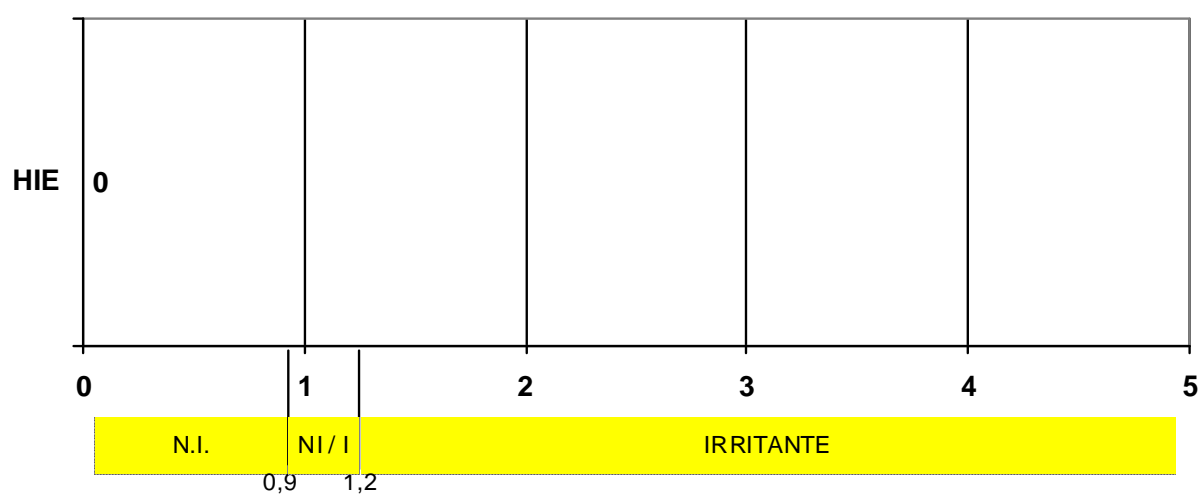
(2).- IRRITECTIONTM ASSAY SYSTEM Instruction Manual. In Vitro International 16632 Millikan Avenue, Irvin. Ca 92714. 1996.

(3).- F.H. KRUSZEWSKI

(3).- D. MOUGIN y otros. Correlation Between Rabbit Testing, *In Vitro* Testing and Human Patch Testing In the Evaluation Of Skin Irritation Of Cosmetics. Vy. Y

11.- RESULTADO

HUMAN IRRITANCY EQUIVALENT (HIE): 0,00




N.I. NO IRRITANTE (0 – 0,9)

N.I. / I. NO IRRITANTE / IRRITANTE (0,9 – 1,2)

I. IRRITANTE (1,2 – 5)

12.CONCLUSIONES

Realizado el ensayo por el método descrito, la muestra AMPOLLA FLASH Ref. DIET puede considerarse **NO IRRITANTE (HIE = 0,00)**



Núria Alvarez i Genoher

Directora Unidad de Ensayos Tóxico-biológicos

Mataró a 12 de marzo de 2010