



Horizonte Médico

ISSN: 1727-558X

horizonte_medico@usmp.pe

Universidad de San Martín de Porres

Perú

Inocente Camones, Miguel Ángel; Toscano Guerra, Emily Marisol; Castañeda Castañeda, Benjamín
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, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637129003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Efecto irritante in vitro de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam.

Miguel Ángel Inocente Camones ¹, Emily Marisol Toscano Guerra ², Benjamín Castañeda Castañeda ³

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto irritante de formulaciones cosméticas con extractos de camu camu.

Material y Métodos: El presente estudio se realizó con formulaciones cosméticas de extractos de camu camu, proporcionadas por el Laboratorio de AYRU COSMETIC; utilizamos la técnica alternativa in vitro, en membrana corioalantoidea en huevos fértiles de gallina (HET 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.

Resultados: 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.

Conclusiones: 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. (Horiz Med 2013; 13(2): 12-18)

Palabras clave: Efecto irritante, formulaciones cosméticas, extracto de camu camu, HET CAM test. (Fuente: DeCS BIREME)

Irritant effect in vitro of cosmetic formulations with camu camu extract by Het Cam method

ABSTRACT

Objective: To evaluate the irritant effect of cosmetic formulations elaborated with camu camu extracts.

Material and Methods: This study was performed with cosmetic formulations containing camu camu extracts supplied by the AYRU COSMETIC Laboratory. We used the alternative in vitro technic on chorioallantoic membrane in fertile hen's eggs (HET CAM, hen's egg chorioallantoic membrane test). The technique was implemented at "Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología" of the Research Institute of the school of Medicine of San Martin de Porres University.

Results: None of the cosmetic with Camu Camu extracts showed chorioallantoic membrane rupture, which was verified by the absence of absorbed trypan blue dye, detectable at 595 nm.

Conclusions: The rates of irritation (II) obtained in all cosmetic formulations allow us to classify them as NOT IRRITATING and support the safety of such products to continue clinical efficacy trials. (Horiz Med 2013; 13(2): 12-18)

Key words: Irritant effect, cosmetic formulations, Camu Camu extract, HET CAM test. (Source: MeSH NLM)

¹ Químico Farmacéutico. Investigador del Centro de Medicina Tradicional y Farmacología. FMH-USMP.

² Bachiller de Biología. Asistente del Centro de Medicina Tradicional y Farmacología. FMH-USMP

³ Director del Instituto de Investigación de la FMH-USMP

INTRODUCCIÓN

La tendencia europea para obtener productos cosméticos seguros, 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, en nuestro país son escasos los estudios realizados con productos cosméticos a base de extractos vegetales, a nivel de seguridad y eficacia (1).

En el caso de la evaluación del riesgo de los productos químicos, se plantea la ejecución de nuevos métodos de evaluación toxicológica. Los ensayos toxicológicos, in vivo, se han empleado históricamente en la evaluación de la inocuidad y seguridad de los ingredientes de cosméticos. Sin embargo, en años recientes se ha criticado el empleo de tales ensayos, debido a los altos costos de ejecución, además del cuestionamiento, cada vez mayor, de los grupos de defensa de conductas éticas y ambientalistas en la industria cosmética.

El desarrollo de estos ensayos, y la actual demanda social y legislativa, propician la implantación de las tres “erres” (RRR) de Rusell y Burch: reducción, refinamiento y reemplazo.

En respuesta a este escenario, se ha dedicado esfuerzos y recursos a la búsqueda de ensayos toxicológicos alternativos, basados en análisis in vitro, todo lo cual ha motivado que exista una corriente de fomento para el desarrollo científico de métodos que contribuyan a disminuir la utilización de animales en las pruebas toxicológicas y de control de sustancias (1-5).

Los ensayos de irritación ocular y dérmica en conejo (test de Draize), muy utilizados, son, actualmente, muy criticados, por lo que en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología de la FMH-USMP, estamos abocados en la implementación de otros métodos, seguros, eficaces y sencillos, que puedan reemplazarlos.

El ojo del conejo, aunque similar en tamaño al ojo humano, difiere de éste en numerosos aspectos. Estas diferencias en la fisiología, unida a la subjetividad que tiene el ensayo para valorar las lesiones y a la variabilidad de resultados, encontrados al ensayar un mismo producto entre distintos laboratorios, hacen lógicas las objeciones a este ensayo.

Sin embargo, el ensayo de Draize, cuando es realizado

por personal experto, es muy preciso para evaluar sustancias irritantes del ojo humano, especialmente cuando se trata de sustancias ligeramente irritantes.

La evaluación de la irritabilidad ocular in vivo según el método de Draize requiere la aplicación de la sustancia de ensayo en la conjuntiva del animal de experimentación (conejo), sometiéndolo, en muchos casos al dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares.

Aunque, últimamente se ha aceptado la disminución del número de animales en esta prueba, aún constituye un ensayo cruento y rechazado por muchos investigadores y personal relacionado, que ven en los métodos in vitro una alternativa útil no sólo para evitar la exposición innecesaria de los animales a productos potencialmente tóxicos sino que, además, logran una mayor correlación de los resultados obtenidos con el humano que con los ensayos en animales (6-11).

Actualmente, numerosos laboratorios en el mundo han incorporado 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 (12-20).

En el Perú, la utilización de métodos alternativos para evaluar toxicidad es escasa; sin embargo, la normatividad mundial exige que la investigación científica incluya toxicidad o funcionalidad de los productos cosméticos, evaluada con métodos alternativos al uso de animales de experimentación.

El método HET CAM para evaluar irritabilidad, aún no ha sido implementado en los laboratorios peruanos de investigación, por lo cual consideramos que el presente trabajo es pionero en nuestro medio, y la implementación de la técnica para productos cosméticos en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres sirva como referencia de control de seguridad para productos cosméticos y afines.

MATERIAL Y MÉTODOS

La crema, gel y loción evaluados, fueron elaborados en el Área de Investigación y Desarrollo de la empresa peruana AYRU COSMETIC SAC.

La composición de estas se expone a continuación, Tabla 1.

Tabla 1. Composición y usos de los cosméticos de origen natural evaluados

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	PROPIEDADES
Crema de camu camu con filtros solares	Extracto de camu camu 15% Benzofenoma 3, Benzofenoma 4 Preservante: Ácido sórbico Excipiente csp.	Humectante Regenerativa para la piel Antioxidante Filtro solar
Gel de camu camu con filtro solar	Extracto de camu camu 25% Benzofenoma 3 Preservante: Ácido sórbico Excipiente csp.	Humectante Regenerativa para la piel Antioxidante Filtro solar
Loción de camu camu con filtro solar	Extracto de camu camu 40% Benzofenoma 3 Preservante: Ácido sórbico Excipiente	Humectante Regenerativa para la piel Antioxidante Filtro solar

Se utilizó huevos fértiles de *Gallus gallus domesticus* (especie resistente a enfermedades) suministrados por la criandera Orfelinda, mediante convenio con el autor del trabajo de investigación para exclusividad de la producción.

Prueba HET CAM, mediante el método observacional o cualitativo:

El proceso de incubación de los huevos comenzó, máximo, dos días después de ovado, los que se mantuvieron bajo condiciones normales de incubación artificial hasta el décimo día en que se determinó el potencial irritante. (Laignier, 2009) (16).

El décimo día se evaluó la viabilidad de los huevos fértiles, mediante luz artificial, escogiendo los huevos en los que se distingue la disposición de venas de tamaño regular.

Con ayuda de tijera y pinza, se realizó un orificio por la zona de la cámara de aire, dejando expuesta la membrana corioalantoidea (los huevos con la membrana corioalantoidea lesionada no fueron aceptados, ni aquellos que presentaban un desarrollo embrionario anormal). Se adicionó 2 mL de suero fisiológico para humedecer la capa que cubre la membrana corioalantoidea, durante 5 minutos.

Luego se procedió a retirar la capa con una pinza

metálica. Después se aplicó 0,3 mL de la crema, gel o loción, sobre la membrana corioalantoidea expuesta, de tres huevos por cada muestra problema. Como controles positivos se utilizaron soluciones de NaOH 0,1N y laurilsulfato de sodio (LSS) 1%, en estos casos sólo son necesarios 2 huevos por patrón.

El tiempo (segundos) de la aparición de hemorragia, lisis y coagulación se anotaba dentro de los 300 segundos y se ingresaba los datos a la siguiente formulación:

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

Donde:

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 muestras y controles, se compara con la tabla 2 para determinar si el producto era irritante:

Tabla 2. Clasificación para determinar que el producto es irritante

RANGO HET CAM	CATEGORÍA IRRITANTE
0,0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

Prueba HET CAM, mediante el método de colorante Azul de Tripán

Para la prueba con el colorante azul de tripán (HET-CAM TBS) se efectuó, previamente, un escaneado (500-700 nm) para conocer el punto de máxima absorbancia del colorante (INVITOX, protocolo N° 108, 1996) (21).

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

La membrana se lavó con agua destilada y se depositó 0,5 mL de la solución de azul de tripán al 0,1% en buffer fosfato, dejándola actuar durante 1 minuto. Luego, se retiró el colorante con agua destilada y la membrana se cortaba y pesaba en balanza analítica. La membrana lavada, se pesó para eliminar el sesgo de la diferencia en el tamaño de cada muestra.

Posteriormente se introdujo en un tubo con 5 mL de formamida para arrastrar el colorante fijado y luego se retiraba la membrana

Se midió la absorbancia de la formamida teñida frente a una recta patrón con concentraciones conocidas del colorante (5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M), a una longitud de onda de 595 nm. La detección de colorante absorbido indica pérdida de la integridad de la membrana corioalantoidea.

La determinación del potencial irritante de la sustancia de ensayo se realizó según la fórmula:

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

Donde:

CA = Cantidad de colorante absorbido

b = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

La comparación se realizó entre los embriones tratados con las sustancias de ensayo y los controles positivo y negativo. Con el dato obtenido se determinó la clasificación de irritación.

RESULTADOS

Según la tabla 2, el índice de irritación obtenido para la crema, gel y loción elaborados con extracto de camu camu, clasifica como NO IRRITANTE, pero el control de hidróxido de sodio y lauril sulfato de sodio, resultan ser clasificados como IRRITANTES SEVEROS, según la tabla 2, y como podemos observar en las figuras 1, 2 y 3. .

Tabla 4. Control de característica del producto.

PRODUCTO	ABS.	PESO membrana (mg)	Concentración colorante Moles/mg	Colorante absorbido *
CREMA	0,0205	82,05	$6,266 \times 10^{-9}$	$0,031 \pm 0,002$
GEL	0,0220	66,95	$8,350 \times 10^{-9}$	$0,042 \pm 0,007$
LOCIÓN	0,0240	83,03	$7,464 \times 10^{-9}$	$0,037 \pm 0,015$
Suero fisiológico	0,0230	133,6	$4,427 \times 10^{-9}$	$0,022 \pm 0,000$
NaOH 0,1 N	0,1240	85,05	$4,273 \times 10^{-8}$	$0,214 \pm 0,080$
Lauril sulfato de sodio 1%	0,0475	51,35	$2,727 \times 10^{-8}$	$0,136 \pm 0,0141$

* Resultados expresados en Promedio \pm Desviación estándar

Tabla 3. Resultados de la prueba HET CAM, método observacional

PRODUCTO	H *	L *	C *	I.I
CREMA	>300	>300	>300	0
GEL	>300	>300	>300	0
LOCIÓN	>300	>300	>300	0
NaOH (control)	125	12	14	18,29
LSS (control)	>300	19	94	12,79

En el caso del ensayo HET CAM con el colorante azul de tripán, trabajamos con una longitud de onda (λ) de 595 nm, donde detectamos la máxima absorbancia del colorante. Se realizó la curva de calibración del colorante azul de tripán para determinar la ecuación de la recta, Figura 4, para la obtención de la concentración de colorante absorbido detallado en las Tablas 3 y 4.

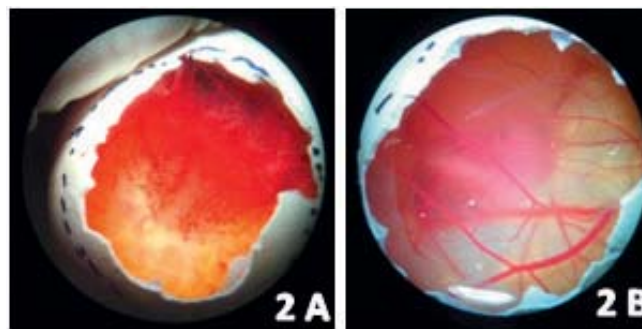


Figura 1. Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0,1 N en la membrana corioalantoidea.
1A. Adición de NaOH 0,1 N, se observa coágulos y hemorragia;
1B. Sin adición de sustancia.

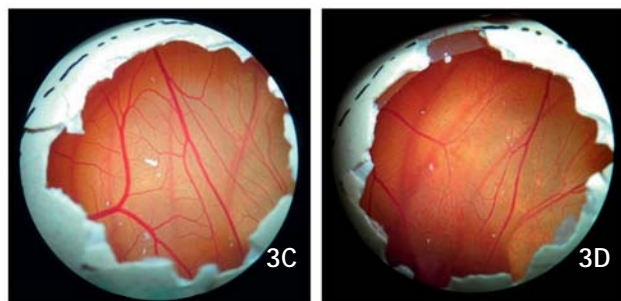


Figura 2. Evaluación del efecto del Laurilsulfato de sodio 1%, en la membrana corioalantoidea.
2C. Adición de Laurilsulfato de sodio 1%, se observa lisis y coágulos;
2D. Sin adición de sustancia.

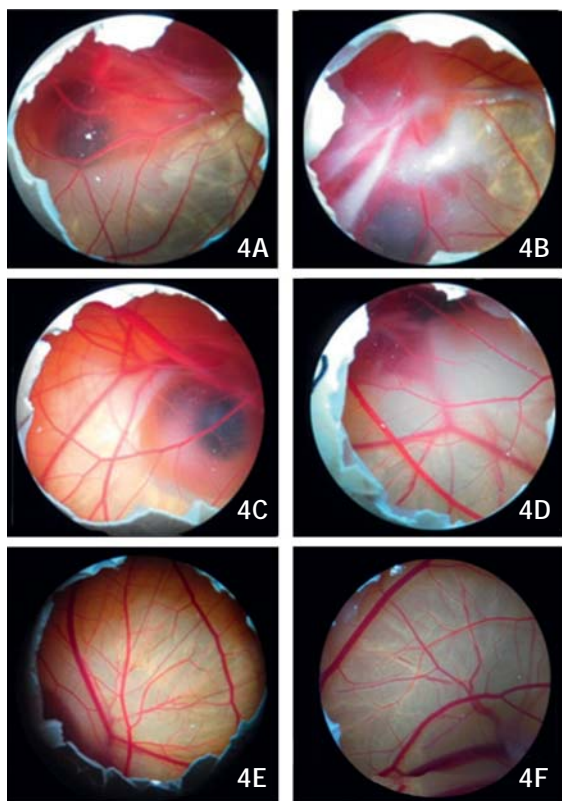


Figura 3. Evaluación del efecto de la crema, gel y loción con camu camu, en la membrana corioalantoidea.
3A. Sin adición de sustancia; 3B. Adición de crema; 3C. Sin adición de sustancia;
3D. Adición de gel; 3E. Sin adición de sustancia; 3F. Adición de loción.

En la figura 4, se muestra la cantidad de colorante absorbido por la formamida, luego de ocurrido el daño celular en la membrana corioalantoidea; la crema, gel y loción, clasificaron como NO IRRITANTES en comparación con los controles positivos laurilsulfato de sodio 1% Hidróxido de sodio 0,1 N que clasificaron como IRRITANTE MODERADO e IRRITANTE SEVERO respectivamente, según la tabla 2.

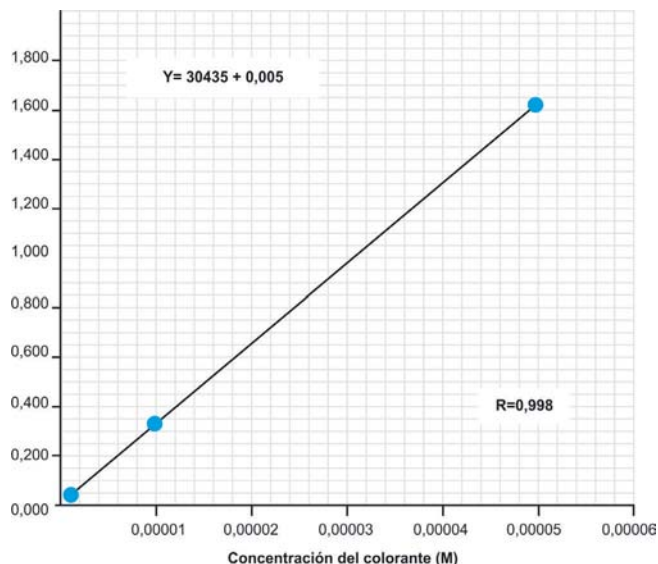


Figura 4. Curva de calibración del colorante Azul de Tripán en formamida

DISCUSIÓN

La utilización de la Membrana Corioalantoidea de embriones de *Gallus gallus domesticus* como un medio de evaluar la irritación producida por un cosmético sobre la mucosa ocular y nasal se basa en que la Membrana Corioalantoidea presenta un epitelio similar a la mucosa ocular y nasal, con una amplia red vascular que permite evaluar las lesiones de hemorragia, lisis y coagulación que ocurren en dichos vasos, así como la desnaturalización de las proteínas extravasculares, lo cual indica diversos grados de irritación (7-22).

Además, estos embriones de 10 días no poseen un sistema nervioso desarrollado y por lo tanto no están sometidos al sufrimiento que pudiera producir una irritación severa, cumpliéndose así con el principio de las 3Rs que deben tener los métodos alternativos en toxicología: refinamiento, que significa reducción del sufrimiento animal, reemplazamiento y reducción en el número de animales de laboratorio a emplear (23).

Varios investigadores, han señalado la alta correlación entre los resultados alcanzados por este método alternativo y las pruebas in vivo, por el método de Draize.

La industria de los cosméticos ha sido una de las más beneficiadas con esta técnica, teniendo en cuenta que estos productos están diseñados para tener poca o ninguna penetrabilidad y por tanto su aval de seguridad debe contemplar las pruebas de irritabilidad dérmica y oftálmica (14,20,24-27).

Los resultados de la investigación realizada son similares con los resultados del estudio realizado por González Y, et al; en el cual se ha evaluado la irritabilidad oftálmica de tres cremas cosméticas mediante la técnica alternativa in vitro en membrana corioalantoidea utilizando la prueba subjetiva HET CAM y la prueba objetiva HET CAM TBS (13).

El ensayo HET CAM, se basa en cambios macroscópicos producidos en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, como son la hemorragia, lisis y coagulación, identificados con estereomicroscopio. Esta prueba tiene un sistema de puntuación subjetivo, por lo tanto se complementa con la prueba de HET CAM-TBS, utilizando el colorante azul de tripán, como un medio de contraste para distinguir células vivas y muertas. En este ensayo, se cuantifica la cantidad de azul de tripán absorbida por la membrana corioalantoidea dañada. La prueba es sencilla, cuantitativa y reproducible (28-30).

En conclusión, los índices de irritación (I.I) obtenidos, en todos los casos, permiten clasificar a los productos como NO IRRITANTES. Ninguno de los cosméticos con extracto de camu camu, mostró ruptura de la membrana biológica, lo cual se verificó por la ausencia del colorante absorbido detectable a 595 nM. Estos resultados permiten avalar la seguridad de estos productos cosméticos para continuar con pruebas de eficacia clínica.

Se recomienda confirmar estos datos con investigación histopatológica.

AGRADECIMIENTO

Al Decano de la Facultad de Medicina Humana Dr. Frank Lizaraso Caparó por haber hecho posible la realización de la presente investigación. A la empresa AYRU COSMETIC SAC por los productos cosméticos y a la Criandera Orfelinda por brindar los huevos fértiles exclusivos para el trabajo de investigación.

Fuentes de financiamiento

El presente trabajo fue financiado por el Programa del FINCYT y los equipos de la Universidad de San Martín de Porres.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcalde M. Cosmética natural ecológica Regulación y clasificación. OFFARM 2008; 27: 96-104.
2. Vinardell MP. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. Acta Bioethica 2007; 13: 41-52.
3. Russell WMS, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. London; Methuen and Co Ltd; 1959.
4. Pepa E, Guadapo A. Métodos alternativos. Rev Toxicol 1999; 16: 145.
5. Vaquero PC, González PJ. Métodos alternativos a la experimentación animal. Anal Acad Med y Cir Vall 1990; 28: 381-388.
6. Sharpe R. The draize test—motivations for change. Food Chem Toxicol 1985; 23 (2): 139-143
7. Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the draize eye irritation test. Toxicology in vitro 1995; 9(6): 871-929.
8. 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(1-2): 141-179.
9. Liebsch M, Spielmann H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. Toxicol Lett 2002; 28; 127(1-3):27-34.
10. Curren RD, Harbell JW. Métodos alternativos in vitro de la irritación ocular. Environmental Health Perspectives 1998; 106 (2): 485-492.
11. Prinsen MK. The Draize eye test and in vitro alternatives; a left-handed marriage?. Toxicology in vitro 2006; 20(1): 78-81.
12. Scheel J, Kleber M, Kreutz J, Lehninger E, Mehling A, Reisinger K, et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). Regulatory Toxicology and Pharmacology 2011; 59(3): 471-492.
13. 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 de conejos. Revista Electrónica de Veterinaria 2006; 7 (3): 1-7

14. Murillo G, Pérez L, Tur E. Incorporación de dos ensayos alternativos para evaluar irritación ocular en un laboratorio de toxicología. Revista Cubana de Farmacia. 2004; 38(3). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol38_3_04/far03304.htm
15. Murillo G, Pérez U, Tur E, Vinardell M, García G, Pascual J. 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 2003; 20 (3): 187-192.
16. Laignier E, Chiva F, Másquio F, Daflon M, Nunes H. Corroxitex, BCOP and HET CAM as alternative methods to animal experimentation. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2009; 45 (4): 759-766
17. Alany R, Rades T, Nicoll J, Tucker I, Davies N. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention. Journal of controlled release 2006; 11: 145-152
18. Freitas D. Nanocosméticos em Fotoprotecao: Desenvolvimento e Avaliacao de Nanopartículas Poliméricas com Filtros Solares. Centro de Ciencias DA Saude. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tesis de master 2011. Rio de Janeiro.
19. Lagarto A, Vega R, Guerra I, Gonzáles R. In vitro quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. Toxicology in vitro 2006; 20: 699-702.
20. Wilson TD, Steck WF. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. Food and Chemical Toxicology 2000; 38: 867-872.
21. INVITOX. Protocol Number 108. CAM -TBS test. European Center for the Validation of Alternative Methods ECVAM. 1996.
22. Ying Y, Xinfeng Y, Wengai Z, Jinheng C, Jinyu X, Guangyu Y, et al. Combined in vitro test as an alternative to in vivo eye irritation tests. ATLA 2010; 38: 303-314.
23. Balls M. Animal experimentation and the three Rs: past, present and future. ATLA 2009; 37 (2):1-6.
24. Thompson WD, Reid A. Quantitative assays for the chick chorioallantoic membrane. Advances in Experimental Medicine and Biology 2000; 476:226-236
25. Mystkowska-Baczowska ET, Komar A, Samos-Zielinska J, Stroinska W, Rogulska T. Evaluation of the chorioallantoic membrane in the chick embryo to test the irritation potential of chemical and cosmetic products. Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny 1995; 46(4): 407-415.
26. Budai P, Várnagy L. In vitro ocular irritation toxicity study of some pesticides. Acta Veterinaria Hungarica 2000; 48(2): 221-228.
27. Wigger-Alberti W, Spoo J, Schliemann-Willers S, Klotz A, Elsner P. The tandem repeated irritation test: a new method to assess prevention of irritant combination damage to the skin. Acta Dermato Venereologica 2002; 82(2):94-97.
28. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T and Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: Modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. Toxicology in vitro 1991; 5 (4): 301-304.
29. Vinardell M, García L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritation of liquid scintillation cocktails. Toxicology in vitro 2000; 14: 551-555.
30. García L, Gleiby M, Montes de Oca N, Hidalgo L. Estudio de la irritación ocular y dérmica de Pochonia chlamydosporia var. catenulate. Revista de Toxicología 2004; 21(2-3): 103-107.

Correspondencia

Miguel Ángel Inocente Camones
 Dirección: Av. Alameda del Corregidor 1531 - Las Viñas,
 La Molina. Lima - Perú
 Teléfono: 988444121
 Correo electrónico: minocente@farmaceuticos.com

Recibido: 12 de Marzo de 2013
 Aprobado: 03 de Junio de 2013