



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de ramnolípidos a través de metodologías *in vitro*

Liseth Yamile Diaz Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2019

Evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de ramnolípidos a través de metodologías *in vitro*

Liseth Yamile Diaz Rojas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

María Constanza Lozano Álvarez MV MSc PhD.

Línea de Investigación:

Toxicología

Grupo de Investigación:

Grupo de investigaciones toxicológicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

2019

Agradecimientos

A mi directora de Tesis Cony, por recibirme siempre con su mirada crítica y colaboración en momentos de crisis

A Olga Molano y Johana Rojas de los laboratorios de innovación de Belcorp por el soporte económico brindado, además del constante interés por el feliz término de este trabajo.

Al profesor Carlos Moreno y su grupo de estudiantes en el laboratorio de patología de la Clínica de pequeños animales en la Universidad Nacional de Colombia, por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta y soporte en este trabajo de investigación.

Resumen

Para garantizar la seguridad del consumidor es indispensable caracterizar toxicológicamente las sustancias con las que interactúa, cumpliendo requerimientos técnicos y científicos que soporten la evaluación del potencial tóxico al igual que la distribución de las moléculas en la piel. Los surfactantes tienen importancia en cosméticos empleándose tradicionalmente aquellos obtenidos por síntesis química que pueden afectar la salud humana y ambiental. El objetivo del presente trabajo fue contribuir al perfil de seguridad de una mezcla de ramnolípidos obtenida comercialmente con perspectivas de uso en industria cosmética. Fue evaluado su perfil de permeación empleando celdas de Franz con montajes de piel de cerdo que fue sometida a evaluación histológica para valorar la irritación dérmica junto con cultivos celulares; adicionalmente la irritación ocular fue estimada a través de HET-CAM y RBC. Se logró determinar la afinidad de los ramnolípidos por el estrato córneo en donde quedó principalmente retenido (94.2%). Se diseñó una escala para valorar los cambios morfológicos celulares, útiles en la determinación del potencial de irritación dérmica, demostrando que los ramnolípidos no inducen mayores alteraciones histológicas. Los estudios de citotoxicidad sobre líneas procedentes de piel señalaron mayor supervivencia con el biosurfactante que con otros tensoactivos, lo cual también fue demostrado al evaluar la irritación ocular, comprobándose la favorabilidad del uso de esta sustancia. Adicionalmente se calculó la dosis de exposición sistémica (SED) indicando que este biosurfactante implica bajo riesgo al ser usado en dosis apropiadas. Por lo tanto, los ramnolípidos tienen cualidades de seguridad favorables que promueven su uso en la industria cosmética.

Palabras clave: Ramnolípidos, biosurfactante, permeación dérmica, irritación ocular, irritación dérmica, métodos *in vitro*

Abstract

In order to ensure consumer safety it is essential to know toxicity of substances through technical and scientific procedures useful to evaluate toxic potential as well as the distribution of molecules in the skin. Surfactants are important in cosmetics, especially those produced by chemical synthesis; however they can affect human and environmental health. The objective of this work was to contribute to the safety profile of a mixture of rhamnolipids, a novel biosurfactant, with prospects for use in the cosmetic industry. Permeation profile was assessed using Franz cells with pigskin mounts that were evaluated by histology to contribute determining dermal irritation along with cell cultures; also eye irritation was estimated through HET-CAM and RBC. The rhamnolipids had affinity with the stratum corneum where it was mainly retained (94.2%). A scale was designed to assess cellular morphological changes, useful in determining the potential for dermal irritation, demonstrating that rhamnolipids do not induce major histological alterations. Cytotoxicity studies on lines from the skin indicated greater survival with the biosurfactant than with other tensors, which was also demonstrated when evaluating eye irritation, verifying the favorable use of this substance. In addition, the systemic exposure dose (SED) was calculated indicating that this biosurfactant implies low risk when used in proper doses. Therefore, rhamnolipids have favorable safety qualities that promote their use in the cosmetic industry.

Keywords: rhamnolipid, biosurfactant, dermal permeation, ocular irritation, dermal irritation, *in vitro* methods

Contenido

1. OBJETIVOS	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 COSMÉTICOS Y MARCO REGULATORIO	7
2.2 EVALUACIÓN DE SEGURIDAD EN PRODUCTOS COSMÉTICOS	10
2.3 FISIOLÓGÍA DE LA PIEL Y EL OJO HUMANO	15
2.3.1 <i>Fisiología de la piel</i>	15
2.3.2 <i>Mecanismos de transporte en la piel y sus condicionantes</i>	18
2.3.3 <i>Fisiología del ojo</i>	20
2.4 PERMEACIÓN DÉRMICA	22
2.4.1 <i>Pruebas in vitro</i>	23
2.4.2 <i>Piel de cerdo como modelo</i>	25
TABLA 2.4: CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL DE CERDO DOMÉSTICO Y DE HUMANOS (GODIN Y TOITOU, 2007).....	26
2.4.3 <i>Celdas de difusión</i>	27
2.5 IRRITACIÓN DÉRMICA.....	28
2.6 IRRITACIÓN OCULAR	31
2.6.1 <i>Métodos alternativos de evaluación</i>	31
2.7 CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO	33
2.8 TENSOACTIVOS	34
2.8.1 <i>Biosurfactantes</i>	36
2.8.2 <i>Biosurfactantes en la industria cosmética y farmacéutica</i>	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1 SURFACTANTES VALORADOS	47
3.1.1 <i>Ramrólpidos</i>	47
3.1.2 <i>Otros surfactantes</i>	48
3.2 PERMEACIÓN DÉRMICA	48
3.2.1 <i>Obtención de la muestra de piel</i>	48
3.2.2 <i>Equipo de permeación</i>	49
3.2.3 <i>Perfil de permeación</i>	49
3.2.4 <i>Tape stripping</i>	50
3.2.5 <i>Cuantificación de ramrólpidos</i>	51
3.2.6 <i>Cuantificación de cafeína</i>	53
3.3 POTENCIAL DE IRRITACIÓN DÉRMICA	53

3.3.1	<i>Líneas celulares</i>	54
3.3.2	<i>Citotoxicidad en HaCat</i>	56
3.3.3	<i>Citotoxicidad en 3T3 Balb/C</i>	56
3.3.4	<i>Aportes de la evaluación histológica de piel de cerdo</i>	56
3.4	POTENCIAL DE IRRITACIÓN OCULAR.....	57
3.4.1	<i>HET-CAM</i>	57
3.4.2	<i>Lisis de glóbulos rojos</i>	60
3.5	CARACTERIZACIÓN DE RIESGO	62
3.6	ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	65
4.1	PERMEACIÓN DÉRMICA	66
4.2	POTENCIAL DE IRRITACIÓN DÉRMICA	69
4.3	POTENCIAL DE IRRITACIÓN OCULAR.....	77
4.4	CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO	81
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
5.1	CONCLUSIONES.....	83
5.2	RECOMENDACIONES	84

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
<i>BCOP</i>	Opacidad y Permeabilidad Córnea Bovina
<i>CAM</i>	Membrana Corioalantoidea
<i>CAPB</i>	Cocamidopropil betaína
<i>CLS</i>	Cell Line Service
<i>CMC</i>	Concentración micelar crítica
<i>EC</i>	Estrato córneo
<i>GRAS</i>	Generally Regarded As Safe
<i>HBL</i>	Balance hidrófilo-lipófilo
<i>HET-CAM</i>	Prueba en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina
<i>HTS</i>	High Throughput Screening
<i>ICE</i>	Ojo aislado de pollo
<i>MIC</i>	Concentración mínima inhibitoria
<i>OECD</i>	Organización para la cooperación económica y el desarrollo
<i>OTC</i>	Over the counter
<i>PBS</i>	Buffer de fosfatos
<i>PC</i>	Producto cosmético
<i>PCP</i>	Producto de cuidado personal
<i>PCPC</i>	Personal Care Product Council
<i>QSAR</i>	Quantitative Structure Activity Relationship
<i>RBC</i>	Red Blood Cell
<i>RhCE</i>	Epidermis corneal humana reconstruida
<i>RhE</i>	Epidermis humana reconstruida
<i>REACH</i>	Registro, Evaluación y Autorización de sustancias químicas
<i>RL</i>	Ramnolípidos
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato de sodio
<i>SED</i>	Dosis de exposición sistémica
<i>SGA</i>	Sistema Globalmente Armonizado
<i>TER</i>	Resistencia eléctrica transcutánea
<i>TEWL</i>	Pérdida transepidermal de agua

Introducción

El fortalecimiento de la industria cosmética en el país y su enfoque como sector de clase mundial se ve reflejado en las cifras productivas y de exportaciones. Entre 2000 y 2012, la producción de cosméticos triplicó sus valores (de 1200 MUSD a 4000 MUSD); constituyendo además un importante renglón de las exportaciones colombianas (en 2018 los rubros obtenidos por este concepto superaron los 7000 MUSD), para 2018 Colombia se logró consolidar como la cuarta economía latinoamericana en productos de belleza y cuidado personal superando a Chile (CCB, 2019).

La tendencia en el área reguladora para los productos cosméticos es cada vez más rigurosa ya que los nuevos ingredientes que incursionan poseen cada vez mayor multifuncionalidad y se hace explícita la necesidad de evaluar y conocer cabalmente su comportamiento al entrar en contacto con la piel y así garantizar la seguridad del consumidor.

Los surfactantes son usados frecuentemente en la industria cosmética como emulsificantes, siendo las moléculas obtenidas mediante síntesis química las más empleadas. Sin embargo, el actual desarrollo de sustancias químicas está basado en la filosofía de la química verde que entró en auge a inicios de la década de los 90s, donde se busca el diseño de procesos y productos químicos que reduzcan la generación de sustancias peligrosas para la salud humana y el ambiente (Lukic, et al., 2016).

Como respuesta a este requerimiento, en el área de los surfactantes se han estudiado moléculas provenientes de microorganismos denominadas biosurfactantes, entre los que se destaca un grupo especial de glicolípidos, los ramnolípidos. Los glicolípidos empleados en formulaciones tópicas de cosméticos y farmacéuticos son altamente compatibles con la piel, pues estructuralmente son similares a las sustancias endógenas del manto hidrolipídico y por lo

tanto, al ser comparados con los surfactantes tradicionales, se les atribuye baja toxicidad asociada a irritación.

Paralelamente se promociona la habilidad de este tipo de moléculas como promotores de la permeación de activos a través de la epidermis (Lourith y Kanlayavattanakul, 2009). Resulta de gran interés la manera como se distribuyen estas moléculas en las capas de la piel, ya que por definición un cosmético no debe penetrar más allá de la epidermis ejerciendo su efecto a nivel local (FD&C, 2013). Sin embargo, estas son moléculas novedosas y la información relacionada con la caracterización del perfil de seguridad, incluyendo la distribución y permanencia en las capas de la piel, no es ampliamente divulgada.

La adecuada caracterización biológica y toxicológica de las nuevas materias primas usadas en la industria cosmética es un requisito para su comercialización, de manera que se garantice la seguridad del consumidor. Esta evaluación debe estar a la vanguardia con los requerimientos técnicos y científicos, siguiendo las diferentes directivas y regulaciones. En este sentido es de especial importancia, no solo la evaluación de los posibles efectos tóxicos sino también la caracterización de la permanencia y distribución de las moléculas a través de ensayos de permeación, y si es el caso de absorción dérmica, así como los cambios celulares que éstas puedan generar.

Las entidades reguladoras de la Comunidad Europea, de los Estados Unidos y la Comunidad Andina de Naciones, dentro de sus directivas para el ámbito cosmético establecen que toda materia prima y producto terminado debe tener caracterizada la identidad química, así como el perfil toxicológico, dentro de este último se hacen indispensables estudios de corrosión/irritación y penetración/absorción dérmica (SCCS, 2015; Nohinek et al., 2010). Estas evaluaciones deberían hacerse a través de metodologías *in vitro* ya que la Comisión Europea desde 2013 impide la comercialización de cosméticos que han sido testeados en animales (Directiva 2003/15/CE), la FDA sugiere considerar métodos alternativos para el mismo fin (FDA, 2004) y el congreso colombiano en diciembre de 2018 aprobó el proyecto de Ley 120/2018C que prohíbe la experimentación con animales para evaluar seguridad o eficacia de los cosméticos, directriz que a mediano plazo podría aplicarse a la región como parte de la armonización del marco regulatorio. Se requiere por lo tanto el acceso a metodologías *in vitro*, y en caso necesario

adaptar estas pruebas a nuestras posibilidades, para poder derivar información útil que apoye a la industria cosmética nacional y a los entes encargados de la toma de decisiones.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de irritación dérmico y ocular, así como la capacidad de permeación de una mezcla de ramnolípidos empleando metodologías *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Implementar la metodología analítica que permita detectar y cuantificar mezclas de ramnolípidos en una matriz acuosa.
- Determinar la permeación dérmica de los ramnolípidos y su distribución en cortes de piel.
- Evaluar posibles cambios celulares en cortes de piel expuestos a una mezcla de ramnolípidos.
- Valorar el potencial de irritación dérmica de la mezcla de ramnolípidos sobre queratinocitos y fibroblastos.
- Valorar el potencial de irritación ocular de la mezcla de ramnolípidos a través de HET - CAM y RBC.
- Comparar el perfil de irritación obtenido de la mezcla de ramnolípidos con información existente de surfactantes tradicionalmente empleados.
- Sugerir niveles seguros de uso del biosurfactante para la industria cosmética.

2. Marco Teórico

Los productos cosméticos (PC) y de cuidado personal (PCP) entran en contacto con superficies corporales (piel, mucosas, globo ocular) que podrían resultar lesionadas, por lo tanto, se hace indispensable la adecuada caracterización de la seguridad de las materias primas con las cuales se elaboran. Los principales efectos que estos productos generan se relacionan con procesos de irritación y sensibilización. Adicionalmente, es importante considerar la posible penetración y/o absorción de los ingredientes de estas formulaciones a través de la piel, particularmente considerando las nuevas materias primas que se emplean actualmente cuyas características aumentan el riesgo de interacciones más fuertes. Otro factor por considerar es que la evaluación de seguridad de los cosméticos hoy en día debe hacerse sin el empleo de animales, existiendo numerosas alternativas a los estudios *in vivo*.

2.1 Cosméticos y Marco Regulatorio

Alrededor del mundo la definición de PC/PCP es diversa y tal como se aprecia en las Tablas 2.1 y 2.2, la clasificación de ciertos productos puede variar de acuerdo con el marco regulador bajo el cual se comercialicen, incluso algunos son considerados medicamentos OTC o cuasidroga, lo que implica exigencias diferentes para su venta y uso.

La UE exige también que los productos cosméticos colocados en el mercado sean seguros; es decir, "*no deben causar daños a la salud humana cuando se aplican en condiciones de uso normales o razonablemente previsibles*" estableciendo una serie de condiciones para su evaluación; Japón adoptó una lista de ingredientes prohibidos, una de ingredientes restringidos, así como una lista positiva de filtros UV y de conservantes; y la CAN en el artículo 4 de este

reglamento establece que los ingredientes incluidos en la formulación pueden ser sometidos a revisión si existe indicio de afectaciones a la salud.

Tabla 2.1: Definición de cosmético en diferentes regulaciones

País	Entidad	Normativa	Definición
Estados Unidos	Food and Drug Administration (FDA)	Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FD&C Act)	Artículos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, o aplicados de otra manera al cuerpo humano... para la limpieza, embellecimiento, promoción del atractivo o alteración de la apariencia. Cualquier sustancia o preparación destinada a ponerse en contacto con las diversas partes externas del cuerpo humano (epidermis, sistema capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas de la cavidad oral con la única o principal finalidad de limpiarlas, perfumarlas, cambiar su apariencia y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buenas condiciones.
Unión Europea (UE)	Parlamento Europeo	Directiva de Cosméticos de Unión Europea (CE 1223)	Artículos con acción leve en el cuerpo humano, que están destinados a ser aplicados a través de frotar, rociar u otro método, con el objetivo de limpiar, embellecer y aumentar el atractivo, alterar el aspecto o mantener la piel o el cabello en buenas condiciones.
Japón	Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar	Ley de Asuntos Farmacéuticos (Ley No. 145)	Toda sustancia o formulación de aplicación local a ser usada en las diversas partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos o en los dientes y las mucosas bucales, con el fin de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y protegerlos o mantenerlos en buen estado y prevenir o corregir los olores corporales.
Colombia	Comunidad Andina de Naciones (CAN)	Decisión 833, 2018	

Tabla 2.2: Categorización de algunos productos en diferentes mercados

Tipo de producto	de Mercado	UE	USA	Japón	Mercosur
Jabón para manos		Cosmético	Cosmético	Cosmético	Cosmético grado I
Labial		Cosmético	Cosmético	Cosmético	Cosmético grado I
Protector solar		Cosmético	Medicamento OTC	Cosmético	Cosmético grado II
Tinte para cabello		Cosmético	Cosmético	Cuasi-medicamentos	Cosmético grado II
Crema dental anti-caries		Cosmético	Medicamento OTC	Cuasi-medicamentos	Cosmético grado II
Antitranspirante		Cosmético	Medicamento OTC	Cuasi-medicamentos	Cosmético grado II
Loción antiacné		Cosmético o medicamento	Medicamento OTC	Cuasi-medicamentos	Cosmético grado II

Tomado de: Masson, 2018.

2.2 Evaluación de seguridad en productos cosméticos

A pesar de la amplia diversidad regulatoria, la evaluación de seguridad en UE, Estados Unidos y otros países, está direccionada a que estos productos deben “*ser seguros en condiciones normales de uso*” (Nohynek et al., 2010) recayendo esta responsabilidad en el fabricante.

Dada la creciente exposición a PC y PCP, la seguridad de estas formulaciones y sus ingredientes debe ser evaluada a profundidad antes de su comercialización (Hartung, 2008), considerando que estas sustancias tienen la posibilidad de producir efectos locales en la piel como irritación, sensibilización o fotorreacciones.

La evaluación toxicológica y de seguridad de PC y PCP y sus ingredientes ha tomado gran relevancia en las últimas décadas. Hacia 1960 se creía que los PCP siempre permanecerían en la superficie del cuerpo humano, por lo tanto, los efectos locales fueron la principal

preocupación de seguridad. Las primeras pruebas estandarizadas *in vivo* para la irritación de la piel y los ojos fueron desarrolladas en 1944 por Draize; entre 1960 y 1970 se desarrollaron ensayos adicionales para la evaluación de la seguridad de estos productos como la sensibilización *in vivo* (realizada sobre cobayos), fototoxicidad y fotosensibilización (SCCS, 2015).

Hoy en día se ha reconocido que algunas sustancias aplicadas tópicamente pueden penetrar la piel y producir exposición sistémica, esto desencadenó el desarrollo de ensayos para evaluar el potencial de penetración percutánea de sustancias, así como la investigación de su potencial toxicidad sistémica. Es por ello que se hace necesaria una oportuna evaluación del riesgo de nuevas sustancias químicas para identificar potenciales tóxicos y prevenir la exposición a niveles inseguros. Finalmente, durante los últimos años, se han desarrollado métodos alternativos que podrían reemplazar completamente las pruebas con animales (Nohynek et al., 2010).

El desafío toxicológico para la industria de PC/PCP es evaluar la seguridad de los materiales de manera confiable, sin demasiada inversión de recursos y sin el uso de animales, teniendo en cuenta que existen normativas (Directiva 76/68/EEC, SB 1249) que prohíben su empleo para la valoración de ingredientes cosméticos. Adicionalmente, la legislación REACH (normativa europea que insta el Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias químicas) establece como obligatorio el registro de datos concernientes a irritación dérmica así como información acerca de la permeación dérmica (Hartung, 2008) y sugiere las pruebas toxicológicas en animales como un último recurso; lo anterior dispuso una fuerte presión sobre la industria cosmética y los centros de investigación para el desarrollo de metodologías alternativas. Adicionalmente, programas investigativos como 'Tox21' promovieron la aplicación de HTS (high throughput screening) sobre cultivos de células humanas destinadas a reconocer diferentes puntos finales toxicológicos (Hitzler et. al, 2013).

Tabla 2.3: Algunas alternativas *in vitro* para evaluaciones toxicológicas

Ensayo	Alternativa <i>in vitro</i>	Punto final
Irritación ocular	Lisis de glóbulos rojos (RBC)*	Hemolisis y desnaturalización de hemoglobina
	Membrana corioalantoidea de huevo fértil de gallina (HET-CAM)*	Hemorragia, vasoconstricción, coagulación
	Ensayo de opacidad y permeabilidad corneal bovina (BCOP) (OECD TG 437)	Opacidad y permeabilidad corneal
	Ojo aislado de pollo (ICE) (OECD TG 438)	Hinchazón y opacidad corneal
	Cultivos celulares – Exposición a corto plazo sobre células de córnea de conejo (OECD TG 491)	Citotoxicidad a través de la reducción de MTT, el método OECD evalúa la exposición durante 5 minutos
	Ocular Irritection	Turbidez en una matriz proteica que simula las características de la cornea
	Epitelio corneal reconstruido (tejidos) RhE (OECD 492)	Citotoxicidad basada en la reducción de MTT (EpiOcular™)
	Microfisiometro de silicio (SM)	Cambios en el potencial de superficie y cambio en la tasa metabólica
	Irritación de mucosa de babosa mucosa (SMI)	Liberación de moco, lactato deshidrogenasa, proteínas y fosfatasa alcalina de la superficie de la babosa
	Filtración de fluoresceína (OECD TG 460)	Filtración de fluoresceína en una monocapa de células MDCK luego de la exposición a la sustancia
Irritación dérmica	Cultivos celulares células dérmicas*	Muerte celular, CI50 (concentración inhibitoria media)
	Tejidos reconstruidos (OECD TG 439)	Viabilidad celular, IL-1a (EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™)
	Skintex, Irritection Assay System	Turbidez en una matriz proteica que simula las características de la piel
Corrosión dérmica	Resistencia eléctrica transcutanea (TER) (OECD TG 430)	Reducción de TER

14 Evaluación de la permeación y la irritación ocular y dérmica de una mezcla de
ramnolípidos a través de metodologías *in vitro*

Método de la membrana barrera (OECD TG 435)	Cambio de color
Tejidos reconstruidos (OECD TG 431)	Viabilidad celular

* Métodos no oficiales comúnmente aceptados para valorar seguridad
Fuente: Vinardell y Mitjans, 2008; McNamee et al., 2009; ONUDI, 2018.

Actualmente son aceptados métodos de reemplazo (Tabla 2.3) entre los que se incluyen pruebas con cultivos celulares, ensayos basados en microorganismos, pruebas sobre tejidos, ensayos organotípicos, ensayos fisicoquímicos, métodos basados en plantas y métodos QSAR. Dentro de estos métodos existen aquellos que han sido validados respecto a la prueba *in vivo* y cuentan con una guía OECD avalada por entes reguladores, cuya aplicación permite realizar clasificación toxicológica de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado (SGA o GHS, por sus siglas en inglés). Hay también metodologías no oficiales habitualmente empleadas que cuentan con aceptación, ya que son capaces de brindar información acerca de la seguridad de un producto. Aunque lo ideal es emplear métodos oficiales, los aceptados en ocasiones pueden ser de más fácil acceso y brindan información útil al momento de estimar el riesgo que puede representar un ingrediente, o incluso un producto terminado.

Para un mayor entendimiento de los procesos de irritación y permeación es necesario reconocer la fisiología de la piel y el ojo humano.

2.3 Fisiología de la piel y el ojo humano

2.3.1 Fisiología de la piel

La función principal de la piel es proteger al cuerpo de la pérdida de agua y la entrada de posibles compuestos tóxicos, alérgenos, irritantes y microbios. La piel humana está comprendida por la epidermis (capa no vascularizada de aproximadamente 100 μm), la dermis (una capa altamente vascularizada de aproximadamente 500 a 3000 μm) y el tejido subcutáneo subyacente (hipodermis), con glándulas sebáceas y sudoríparas en toda su extensión (Bartosova y Bajgar, 2012). Sin embargo, solo la epidermis es de interés en la industria cosmética ya que por definición un producto cosmético es aplicado y ejerce su función de manera local, de modo que no se espera que alcance de manera directa la dermis donde fácilmente puede ser absorbido y ser llevado a circulación sistémica, efecto indeseable e inesperado para PC/PCP. La dermis está ubicada adyacente a la epidermis y proporciona el soporte mecánico para la piel a través de la unión dermoepidérmica (Figura 2.1) en primer lugar y la red de proteínas estructurales (colágeno y elastina) sintetizadas por los fibroblastos (Bartosova y Bajgar, 2012).

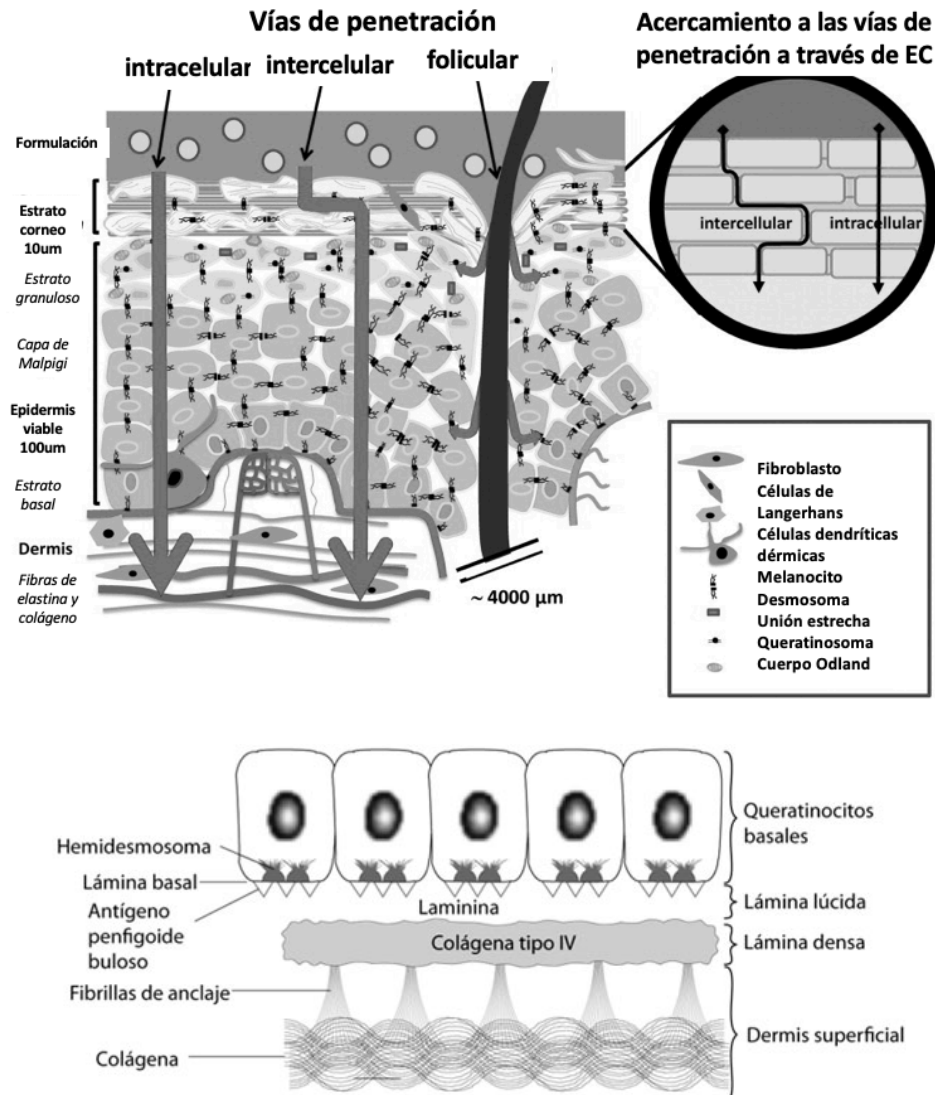


Figura 2.1: Fisiología de la piel. Arriba: capas de la piel y vías de permeación (Modificado de: Bolzinger et al., 2012). Abajo: detalle de la unión dermoepidérmica (Bartosova y Bajgar, 2012).

La epidermis viable es un epitelio estratificado compuesto de células basales, espinosas y granulares y es responsable de la generación del estrato córneo (EC). Estas células se originan en el estrato basal ubicado inmediatamente arriba de la dermis, es el único estrato germinativo de esta capa de la piel. Los queratinocitos del estrato basal están unidos a la membrana basal por hemidesmosomas y adhesiones focales compuestas de varias proteínas. La importancia fundamental de estas proteínas de anclaje a la membrana basal se refleja en los trastornos de la piel asociados con mutaciones genéticas codificantes heredadas y adquiridas, como la

epidermólisis ampollosa distrófica (colágeno tipo VII) y el penfigoide bulloso (integrina $\alpha 6\beta 4$) (Norlen, 2008).

Además de la unión hemidesmosomal, otro sitio para la adhesión de las células del estrato y de la membrana basal de epidermis, son las uniones adherentes. Dichas uniones expresan diferentes proteínas como talina, vinculina y cadherinas; mientras los hemidesmosomas están unidos a la queratina citoplasmática, las proteínas de las uniones adherentes están unidas a los filamentos de actina citoplasmática que juegan además un importante papel en la migración celular (Rigort et al., 2004).

La epidermis es un tejido dinámico, que se renueva constantemente, donde la pérdida de células de la superficie del EC (descamación) se equilibra con el crecimiento celular en la epidermis inferior, por lo tanto, aunque una unión estable entre los queratinocitos basales y la matriz basal es esencial para garantizar la integridad de la piel, estas células deben ser capaces de desunirse y migrar hacia estratos superiores (granuloso y espinoso) iniciando un proceso de diferenciación terminal por el cual acabarán formando el EC, este proceso es mediado principalmente por la acetilcolina dérmica, cuyas vías de señalización incluyen la activación o inhibición de cascadas de quinasa que resultan en la regulación positiva o negativa de la expresión de moléculas de adhesión celular o cambios en el estado de fosforilación, e incluso ambos (Nguyen et al., 2003).

La capa epidérmica más externa es el EC (10-40 μm) y representa la principal barrera para la penetración de la piel (Bartosova y Bajgar, 2012). El recambio celular implicado en su formación tiene una duración de aproximadamente 21 días y se inicia con la aparición de gránulos de revestimiento de membrana en el estrato espinoso cuyo ensamblaje parece tener lugar en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi; en el transcurso del tránsito vertical estas células van aumentando la concentración de dichos gránulos y forman el estrato granuloso. En las etapas finales del proceso de diferenciación, los queratinocitos pierden sus núcleos y otros orgánulos citoplasmáticos, se aplanan y se compactan para formar el estrato lúcido que finalmente constituye el EC (Norlen, 2008).

La composición lipídica del EC es biológicamente única, principalmente conformada por ceramidas de cadena larga, ácidos grasos libres y colesterol, dando como resultado un comportamiento de fase lipídica diferente al de otras membranas biológicas. Investigadores han

sugerido que las fases cristalinas están predominantemente presentes en el lípido intercelular, pero también hay una subpoblación de lípidos que forman una fase líquida, probablemente promovida por la presencia de ácidos grasos libres, de manera que las dos fases coexisten (Norlen, 2008).

2.3.2 Mecanismos de transporte en la piel y sus condicionantes

El proceso de absorción dérmica es un término global que describe el paso de compuestos a través de la piel y se puede dar en tres pasos (Bartosova y Bajgar, 2012):

- Penetración: entrada de una sustancia en una capa o estructura particular, como la entrada de un compuesto en el EC
- Permeación: penetración de una capa a otra, que es funcional y estructuralmente diferente de la primera capa (paso de una molécula del EC a epidermis viva o de esta última a dermis)
- Absorción: captación de una sustancia en el sistema vascular (linfa y/o vaso sanguíneo), que actúa como el compartimento central.

El EC está compuesto de células epidérmicas muertas, parcialmente desecadas y queratinizadas. La estructura del EC en sí puede explicarse en términos del modelo "ladrillo - cemento" en el que los corneocitos representan los ladrillos mientras que los lípidos intercelulares y los factores de hidratación naturales que retienen el agua actúan como el cemento (Bartosova y Bajgar, 2012). Por ello se cree que la permeabilidad de la piel es función casi exclusiva del estado físico y la organización estructural de la matriz de lípidos intercelulares del estrato córneo. No obstante, se debe considerar el grado de hidratación de la barrera y si hay lípidos formadores de cristales líquidos (normalmente lípidos insaturados de cadena media) en la matriz lipídica del espacio extracelular del EC (Norlen, 2008).

El transporte de sustancias químicas a través de la piel es un proceso complejo que no se propicia únicamente por su flujo en el cristal líquido de los lípidos intercelulares y el agua. Hay tres mecanismos principales por los cuales puede ocurrir la absorción en la piel: 1) la **vía transcelular** permite que la sustancia se transfiera a través de los corneocitos rellenos de queratina mediante la partición dentro y fuera de la membrana celular, 2) la **vía intercelular** se

produce cuando el producto químico se transfiere alrededor de los corneocitos en las regiones extracelulares ricas en lípidos y 3) la **vía apendicular** sucede cuando las moléculas ingresan a través de los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas (Wilkinson, 2008). Esta última no se considera relevante en la absorción de muchas sustancias químicas en humanos ya que el área de superficie relativa de estos apéndices es solo 0.1-1.0% del área total (Schaeffel y Redelmeier, 1996). Sin embargo, el área de superficie relativa de estos anexos puede ser de mayor importancia en zonas como el cuero cabelludo, donde los folículos pilosos son más abundantes (Bartosova y Bajgar, 2012).

La penetración de una sustancia química a través del EC es un proceso de difusión pasiva. Para muchos compuestos el EC lipófilo es la principal barrera que restringe la velocidad, sin embargo, la difusión a través de la epidermis y la dermis hidrófila puede limitar la velocidad de los materiales muy lipófilos al igual que lesiones del EC y/o patologías del mismo (Franz, 1990).

Las propiedades fisicoquímicas de la molécula de estudio también condicionan el grado de penetración, entre estas se destacan: 1) el **tamaño molecular** (moléculas con un peso superior a 500 Da no penetran en la piel, esto se debe principalmente a la disposición física de los lípidos entre los corneocitos adyacentes del EC), 2) el **grado de ionización** (la presencia de proteínas dota al EC de grupos con carga positiva y negativa, por ello los iones son débilmente absorbidos a través del EC), 3) la **solubilidad** y el **coeficiente de partición** (la velocidad de permeación es una consecuencia de la partición de la sustancia entre el compartimento acuoso y lipídico de las regiones multilamelares típicas del manto hidrolipídico) (Norlen, 2008; Bartosova y Bajgar, 2012).

Como se mencionaba anteriormente, la permeabilidad de una sustancia a través de una membrana depende también del estado físico de la bicapa. Dado que existe un gradiente de potencial químico de agua sobre la piel que varía con la profundidad de las capas celulares, la difusión a través del estrato córneo no es lineal. Además, otros gradientes (por ejemplo, de pequeños solutos o moléculas anfifílicas) podrían ejercer una influencia sobre el comportamiento de fase de la matriz lipídica multilamelar intercelular (Norlen, 2008).

Un compuesto que entre en contacto con la piel también puede evaporarse de la superficie, unirse al EC, penetrar o metabolizarse. El metabolismo de la piel ha recibido más atención porque la evidencia demuestra que la piel no solo es una barrera para la difusión pasiva sino

también una barrera enzimática capaz de metabolizar sustancias (Mukhtar et al., 1981) ya que contiene enzimas que catalizan las reacciones de Fase I (p. ej. oxidación, reducción, hidrólisis) y Fase II (conjugación) (Martin et al., 1987; Bronaugh et al., 1989). Sin embargo, aunque las actividades basales pueden ser relativamente bajas, si el área superficial de la piel expuesta es muy grande, es probable que el metabolismo de la piel contribuya al metabolismo global del compuesto después de la exposición dérmica; en este sentido se ha demostrado que el metabolismo de la piel tiene gran influencia en la activación de contaminantes ambientales carcinogénicos (Martin et al., 1987).

2.3.3 Fisiología del ojo

El ojo es un globo fibrovascular rodeado por una órbita de hueso que es impenetrable a la luz. La porción anterior del globo ocular es la única porción que está expuesta al medio ambiente, mientras que el resto del ojo está protegido por los párpados y el hueso orbital. El globo ocular está compuesto por tres túnicas concéntricas: fibrosa, vascular y neuroectodérmica (Figura 2.2) (Kobayashi y Kohshima, 1997).

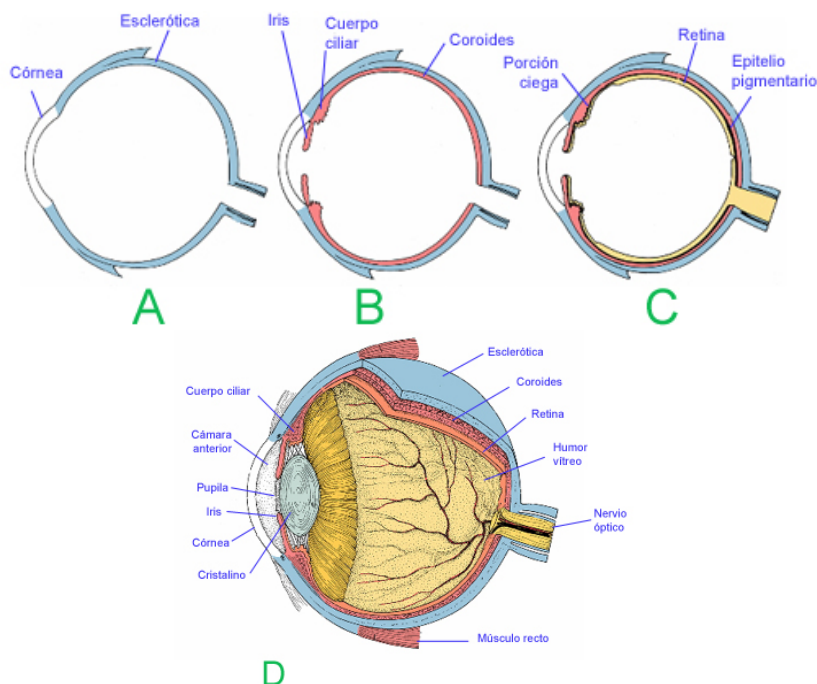


Figura 2.2: Fisiología del ojo. A) túnica fibrosa, B) túnica vascular, C) túnica neuroectodérmica, D) ojo completo (Dimieri, 2015)

La **túnica fibrosa** proporciona el marco primario para el ojo, hacia la parte anterior se halla la córnea transparente, una estructura hidratada no vascularizada, que se compone de tres capas principales: el epitelio, el estroma y el endotelio. El estroma corneal contiene 78% de agua y la hidratación es un requisito para la hinchazón en respuesta a un irritante. La córnea se mantiene nutricionalmente en un estado homeostático por el humor acuoso, la película lagrimal y los tejidos vascularizados circundantes. Se requiere la función apropiada de las células escamosas o cuboidales en la capa endotelial para eliminar agua de la córnea (Kobayashi y Kohshima, 1997).

La córnea es el principal elemento de refracción en la trayectoria óptica, por lo tanto, la transparencia corneal es un factor importante en el funcionamiento óptimo del ojo. Para refracción máxima, la superficie anterior de la córnea, compuesta de capas de células epiteliales translúcidas, es mantenida en una configuración suave por la película lagrimal. El estroma corneal, compuesto de queratocitos translúcidos intercalados con fibrillas de colágeno, requiere uniformidad y adecuado espaciamiento de las fibrillas de colágeno para mantener un índice de refracción corneal apropiado con dispersión mínima de la luz. Esta combinación de estructura celular y morfología sirve para mantener la transparencia corneal. La esclerótica se compone principalmente de tres capas de fibrillas de colágeno dispuestas irregularmente y de diámetro variable. Esta disposición irregular de las fibrillas produce el color blanco que es visto en globos oculares; por su parte, la conjuntiva es una membrana mucosa que cubre la esclerótica expuesta a la superficie al igual que la parte interna de los párpados. Contiene vasos sanguíneos, nervios, glándulas conjuntivales y células inflamatorias. El componente principal de la túnica vascular es el iris que se encuentra frente al lente y al cuerpo ciliar, la contracción del iris altera el diámetro de la pupila y así regula la cantidad de luz que ingresa al ojo (Kobayashi y Kohshima, 1997).

El ojo es críticamente dependiente de la **túnica vascular**, capa media que contribuye a la regulación de sangre, la barrera de permeabilidad ocular, el mantenimiento de la presión intraocular, la formación del humor acuoso y al drenaje del fluido ocular. El tracto uveal está muy innervado por neuronas sensoriales somáticas derivadas de la división oftálmica del nervio trigémino. Es importante destacar que las alteraciones de cualquiera de estas características (p.ej. edema, destrucción celular, vascularización, y/o proliferación celular) pueden causar opacidad corneal y pérdida de la función. El iris hace parte de la túnica vascular, es una

estructura muscular que permite la contracción o dilatación de la pupila (Kobayashi y Kohshima, 1997).

La **túnica neuroectodérmica** está conformada exclusivamente por la retina ubicada en la cavidad posterior (no expuesta al medio ambiente), encargada de convertir las imágenes en señales eléctricas que envía por el nervio óptico al cerebro.

2.4 Permeación dérmica

Uno de los aspectos más importantes para la evaluación de riesgo de las sustancias es la estimación de su biodisponibilidad luego del contacto con la piel (Steiling et al., 2001) determinando si la absorción o la penetración es suficiente para causar toxicidad. No obstante, para muchas sustancias no suelen hacerse ensayos toxicológicos empleando la piel como vía de exposición; por lo tanto, suele asumirse una DL_{50} dérmica de 2 g/kg (para aquellas que no representan un alto riesgo tóxico).

Los modelos fisiológicos para la evaluación farmacológica y toxicológica son representaciones matemáticas de los procesos de transferencia de masa que ocurren cuando una sustancia química se encuentra con un sistema biológico y son representaciones extremadamente simplificadas de los procesos que se modelan; esta simplicidad es una característica esencial dado que en sistemas más complejos existirían muchos parámetros que afectan la medición. Los modelos simplificados que valoran la biodisponibilidad a través de la piel contemplan el tejido como un compartimento (Figura 2.3) y parte de las siguientes suposiciones: los tejidos y compartimentos son homogéneos y el transporte pasivo de productos químicos a través de membranas biológicas se pueden describir mediante modificaciones de la ley de Fick (McDougal, 2008).

Una gran mayoría de los modelos fisiológicos publicados no contemplan la piel como un compartimento de interés, sin embargo, dada la creciente necesidad, varios modelos han incluido la piel como un compartimento separado de depósito para el producto químico o como una ruta de entrada de este (Andersen y Keller, 1984; McDougal, 2008).

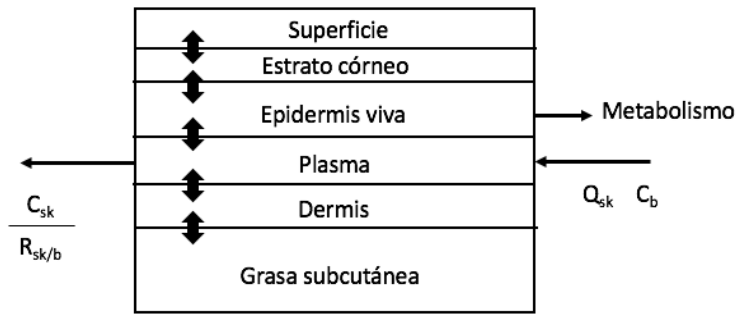


Figura 2.3: Esquema del compartimento de la piel que muestra algunos detalles anatómicos importantes para predecir la absorción dérmica. El plasma recibe una concentración conocida de sustancia (C_b) procedente de la epidermis y lo lleva en el flujo sanguíneo (Q_{sk}). La sangre venosa que abandona la piel es descrita por la concentración de la sustancia en la piel (C_{sk}) dividida por el coeficiente de partición entre la piel y la sangre ($R_{sk/b}$). En este modelo, la difusión controlaría la transferencia de sustancia entre las capas de la piel, y el flujo sanguíneo a la dermis llevaría la sustancia al resto del cuerpo.

2.4.1 Pruebas *in vitro*

El estudio de la cinética dérmica de compuestos sobre voluntarios tiene implicaciones éticas y el uso de animales está casi prohibido, se ha recurrido a métodos *in vitro* que están diseñados para medir la penetración de productos químicos y pueden utilizar la piel no viable para medir solo la penetración o la piel fresca metabólicamente activa para medir simultáneamente la penetración y metabolismo de la piel (OECD, 2004a; Bartosova y Bajgar, 2012; So et al., 2014). Estos ensayos ofrecen otras ventajas como el ahorro en tiempo y costos, una mejor reproducibilidad de los resultados y variaciones de parámetros más restringidas. Aunque las mediciones de penetración percutánea *in vitro* son comunes, las técnicas utilizadas deben considerar cuidadosamente cuatro puntos principales: tipo de sistema celular; fuente de la piel; viabilidad; preparación y composición del fluido receptor (OECD, 2004b). Una limitación asociada con el enfoque *in vitro* es que las condiciones del sumidero ("sink") del flujo sanguíneo periférico pueden no reproducirse por completo (Bartosova y Bajgar, 2012).

La estructura de la piel difiere entre especies e incluso en el mismo individuo según el género y región corporal de origen (So et al., 2014). Por lo tanto, la absorción percutánea depende del

sitio anatómico, la condición de salud de la piel, la edad y el estado de hidratación (Bronaugh et al., 1986).

Las membranas de la piel humana generalmente se preparan a partir de la piel abdominal o mamaria, mientras que para la obtención de la piel animal los sitios comúnmente utilizados son el flanco y el dorso en rata, y el flanco y la oreja en cerdo. Se pueden preparar tres tipos de membranas cutáneas para experimentos *in vitro*: membranas epidérmicas (de 100 μm de espesor aproximadamente; preparado por separación de calor, química o enzimática), piel de espesor parcial (espesor de 200 – 500 μm preparado con dermatomo) y piel de espesor total (500 – 1000 μm) (Bartosova y Bajgar, 2012). Una posible desventaja de la piel de espesor total es que los compuestos lipófilos pueden retenerse en la dermis en lugar de entrar en el fluido receptor. También se debe mencionar que las membranas epidérmicas pueden sobreestimar la absorción de la piel humana *in vivo*, en la medida que no es una condición real de exposición. Aunque la calidad de la piel cultivada o reconstituida ha mejorado de manera importante durante los últimos años, estos cultivos no poseen una función de barrera completa comparable a la de la piel viva debido a su estructura y composición lipídica y (Godin y Toitou, 2007; Ackerman et al., 2010).

Las metodologías oficiales para valorar la permeación dérmica sugieren el empleo de piel muerta o viva (OECD, 2004a) según las necesidades del estudio. Cuando se produce un considerable metabolismo cutáneo del compuesto *in vivo* es recomendable emplear piel viable pues las preparaciones de piel congelada pueden carecer de los sistemas enzimáticos para la biotransformación del compuesto de prueba y pueden no proporcionar una imagen precisa de la formación de metabolitos y su absorción dérmica. Por lo tanto, los estudios *in vitro* que usan piel congelada pueden no proporcionar información completa sobre la absorción dérmica de compuestos que se someten a biotransformación en la piel ni sobre su potencial metabolito formado. El papel de la biotransformación cutánea en el proceso de absorción es aún una cuestión de debate científico. Adicionalmente, la piel viva viable puede ser utilizada para valorar las lesiones que el agente puede ocasionar sobre las células pudiendo aportar al conocimiento del potencial de irritación.

2.4.2 Piel de cerdo como modelo

No existe una única especie animal que coincida exactamente con la morfología y la fisiología de la piel humana. Los modelos de roedores se usan a menudo para que los datos se puedan comparar con otras vías de administración, ya que éstas son las especies predominantemente utilizadas en las pruebas de toxicología. Los conejos y los cobayos se han empleado en pruebas de dermatotoxicología debido a la similitud de la respuesta inmune. Sobre una base puramente morfológica, el cerdo doméstico es el más cercano a la piel humana (Figura 2.4), ya que incluso el modelo de primates es diferente debido a la alta densidad de folículos pilosos (Monteiro-Riviere et al., 2008), además el uso de primates en investigación está altamente restringido.

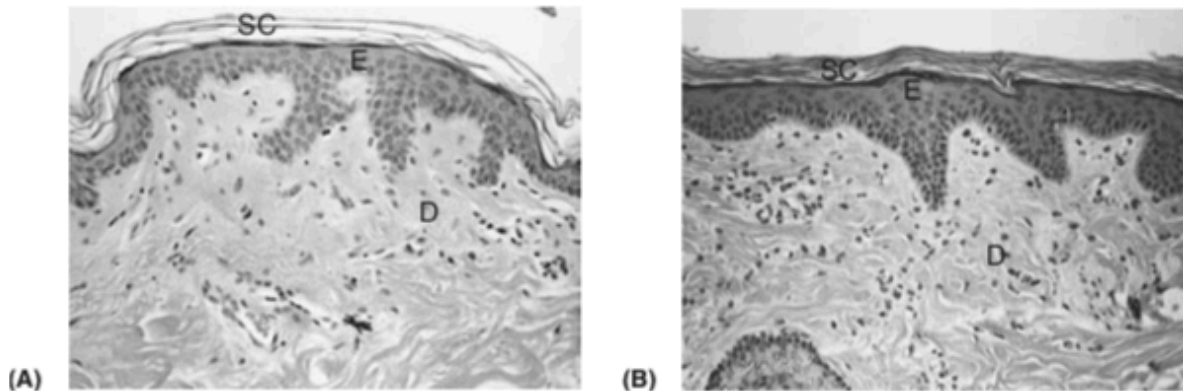


Figura 2.4: Anatomía microscópica de (A) piel humana y (B) piel de cerdo doméstico. Se debe apreciar la similitud en el grosor de la epidermis. Abreviaciones: D: dermis; E: epidermis; SC: estrato corneo (Monteiro-Riviere et al., 2008).

El integumento del cerdo y las características de la superficie son similares a las de los humanos (escasez de folículos pilosos y similar textura). La relación entre eárea de superficie de la piel y el peso corporal en el cerdo se compara favorablemente con la de los humanos, un atributo que no está presente en especies tradicionales de laboratorio. Además, sobre la piel porcina pueden emplearse las mismas técnicas no invasivas e instrumentos utilizados en entornos clínicos humanos ("tape stripping" para extracción del estrato córneo, la evaluación de la pérdida de agua transepidérmica, la velocimetría Doppler con láser y la colorimetría) (Monteiro-Riviere et al., 2008).

El grosor de los estratos de piel de la oreja y el costado del cerdo son similares a la piel humana como se aprecia en la Tabla 2.4. Otras semejanzas entre estas dos especies con relación a la piel son la anatomía vascular y el arreglo de colágeno de la dermis, al igual que el contenido de glicosfingolípidos y ceramidas del EC (Godin y Toitou, 2007).

Tabla 2.4: Características de la piel de cerdo doméstico y de humanos (Godin y Toitou, 2007).

Característica	Especie	Descripción
Estrato córneo	Cerdos	21 – 26 μm
	Humanos	30 μm
Epidermis	Cerdos	66 – 72 μm
	Humanos	70 μm
Infundíbulo de la estructura folicular	Cerdos	Se extiende hasta la dermis
	Humanos	
Vellosidades	Cerdos	20 vellosidades/cm ² (oreja)
	Humanos	14 – 32 vellosidades/cm ² (excepto en antebrazo)

El uso de un cerdo como sustituto de los estudios de absorción percutánea humana ha sido ampliamente revisado y validado durante muchos años. Estas comparaciones son válidas tanto para modelos *in vitro* como *in vivo*. Para la mayoría de los compuestos probados, la absorción a través de la piel de cerdo es muy similar a la de la piel humana, especialmente cuando se compara con modelos de roedores que a menudo difieren en órdenes de magnitud (Schmook et al., 2001; Godin y Toitou, 2007).

Las metodologías oficiales para valorar la permeación dérmica sugieren el empleo de tejido muerto o vivo (OECD, 2004a) según las necesidades del estudio. Cuando se produce un considerable metabolismo cutáneo del compuesto *in vivo* es recomendable emplear piel viable pues las preparaciones congeladas carecen de sistemas enzimáticos necesarios para la biotransformación del compuesto. Por lo tanto, los estudios *in vitro* que usan piel congelada no proporcionan información completa sobre la absorción dérmica de compuestos que se someten a biotransformación en la piel ni sobre su potencial metabolito formado. El papel de la biotransformación cutánea en el proceso de absorción es aún una cuestión de debate científico.

Adicionalmente, la piel viva puede ser utilizada para valorar las lesiones que el agente puede ocasionar sobre las células haciendo aportes al conocimiento del potencial de irritación.

2.4.3 Celdas de difusión

La técnica más común para medir la absorción dérmica *in vitro* es la aplicación de la sustancia de prueba en una formulación adecuada (puede ser radiomarcada) a la superficie de una muestra de piel, que se comporta como una barrera entre el compartimento donador y el compartimento receptor de la celda de difusión. Las celdas pueden ser estáticas o fluidas (Figura 2.5). En las celdas de difusión estáticas el muestreo se hace en la cámara del fluido receptor y se reemplazan con nueva perfusión en cada punto de tiempo, pueden ser horizontales o verticales según la posición de la piel, siendo las primeras las más comunes. Las celdas de flujo continuo usan una bomba para pasar el líquido a través de la cámara del receptor y recolectar el flujo recogiendo el perfundido repetidamente. Las células deben estar elaboradas con material inerte no adsorbente y volúmenes de cámara de receptor de aproximadamente 0.5-10 mL y áreas superficiales de membranas expuestas de aproximadamente 0.2-2 cm². La prueba debe llevarse a cabo con un mínimo de 3 muestras (Bartosova y Bajgar, 2012).

El tiempo de exposición debe reflejar las condiciones de uso; por lo tanto, puede variar entre unos pocos minutos para un producto de enjuague (rinse off) hasta un máximo de 24 horas para un producto sin aclarado (leave on) y de 6 a 8 horas para los productos industriales (OECD, 2004a). La duración del estudio por 24 h puede provocar el deterioro de la membrana y requiere un control cuidadoso de su integridad (se recomiendan métodos como el TEWL (pérdida transepidérmica de agua, por sus siglas en inglés) o la resistencia eléctrica transcutánea (TER). Todos los materiales utilizados en los procedimientos de lavado deben enjuagarse, disolverse o extraerse adecuadamente para una determinación de recuperación (Bartosova y Bajgar, 2012).

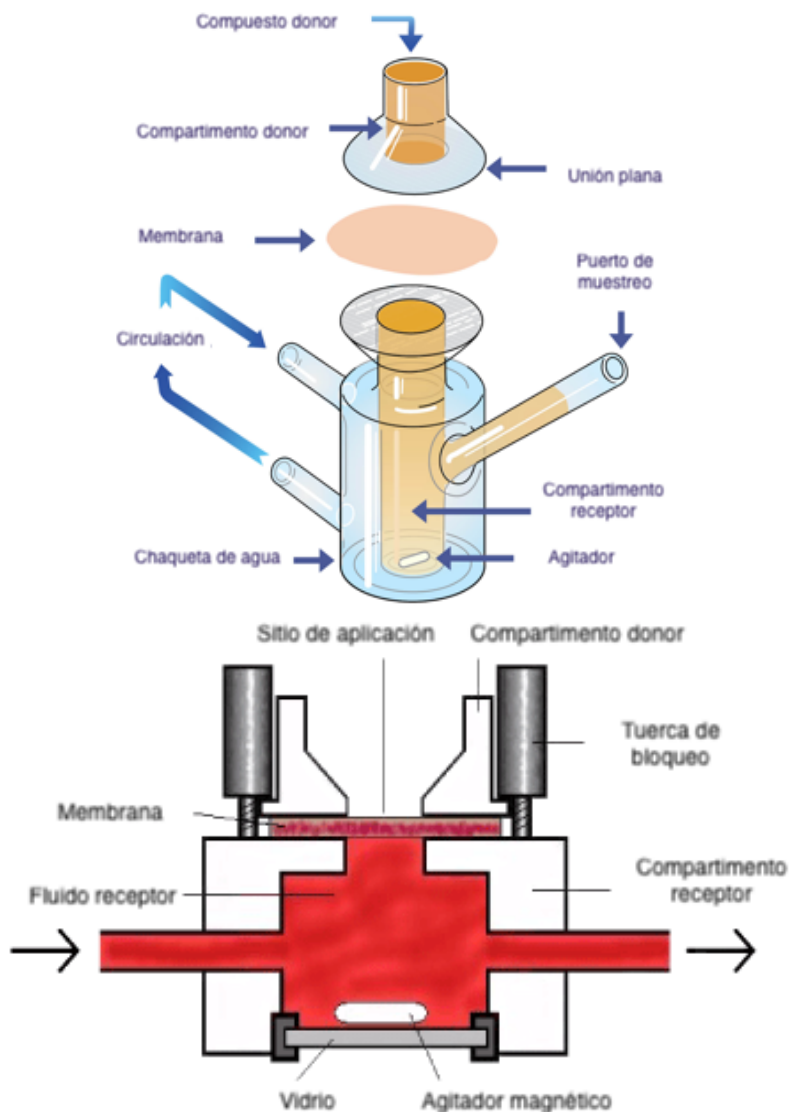


Figura 2.5: Arriba: celda de difusión estática (Pemegear, 2007); abajo: celda de flujo continuo (Bhowmick et al., 2014)

2.5 Irritación dérmica

La toxicidad en piel se relaciona principalmente con la corrosión, la irritación o la sensibilización. Los tipos más frecuentes de toxicidad local son la dermatitis irritativa de contacto y la dermatitis alérgica por contacto, estas reacciones en la piel pueden alterar el flujo sanguíneo y la función de barrera, aumentando la permeación de sustancias y el riesgo de exposición sistémica; pero conocer solo el dato de exposición es insuficiente para predecir la toxicidad local o sistémica si

no se cuenta con información sobre la absorción y penetración en y a través de la piel (Poet y McDougal, 2002).

Las sustancias de uso común que se encuentran presentes en el ambiente o se emplean directamente sobre la piel puede inducir daños irreversibles (corrosión) o reversibles (irritación) que deben ser monitoreados para garantizar la integridad de los individuos y reducir el riesgo de reacciones más graves como la alergia; la irritación de la piel es una reacción inflamatoria reversible producida por la cascada de ácido araquidónico y las citoquinas en los queratinocitos y fibroblastos viables de la piel (Sánchez et al., 2004).

El método tradicional *in vivo* para evaluar la irritación dérmica es la prueba de Draize, en la cual se emplean conejos a los que se aplica tópicamente la sustancia química y se evalúa la aparición de edema y/o eritema a 1, 24, 48 y 72 horas posteriores a la administración, finalmente se clasifica el producto de acuerdo con el grado de irritación generado en los animales (Vinardell y Mitjans, 2008). Sin embargo, el conejo es más susceptible que los humanos y esta metodología sobrestima el potencial irritante de las sustancias allí evaluadas (60% de los resultados son falsos positivos) (Hartung, 2008).

Las alternativas oficiales que actualmente existen para valorar el potencial de irritación dérmica se basan en modelos constituidos por cultivos tridimensionales de queratinocitos (EpiSkin™, SkinEthic™, EpiDerm™), sin embargo, ante la dificultad que supone el acceso a estos tejidos son de utilidad las metodologías de screening aceptadas, entre ellas las pruebas de citotoxicidad sobre fibroblastos y queratinocitos humanos. Los ensayos de citotoxicidad celular constituyen métodos de screening que evalúan la capacidad de las sustancias para causar injuria a estructuras y funciones comunes a todas las células, prediciendo así la viabilidad tisular tras la exposición a sustancias químicas (EURL ECVAM, 2018b; 2018c). Adicionalmente, a través de líneas celulares y empleando puntos finales apropiados pueden predecirse con éxito respuestas corrosivas (Sánchez et al., 2004).

Los queratinocitos humanos se han convertido en el foco de atención en la irritación de la piel gracias a su ubicación, la importancia para mantener la integridad de la barrera del estrato córneo y su capacidad para producir una amplia gama de mediadores inflamatorios; los fibroblastos a su vez resultan de interés cuando se pueden sospechar de procesos de permeación cutánea, de modo que el monitoreo de su comportamiento frente a moléculas

externas es útil para evaluar la respuesta de la piel frente a una agresión química. Sin embargo, a pesar de las ventajas de los modelos *in vitro*, el cultivo celular carece de algunas de las propiedades de la piel intacta, como su función de barrera selectiva o la interacción entre diferentes tipos de células. Por lo tanto, aunque el potencial de irritación puede sobreestimarse con el uso de cultivos celulares, también logra funcionar como una útil herramienta de preselección (Sánchez et al., 2004).

Estudios previos como los de Korting y cols (1994), Ward y cols (1998) y Wilhelm y cols (2001) han sugerido que los queratinocitos humanos cultivados permiten predecir la irritación dérmica causada por varios surfactantes, debido a su relevancia biológica ya que son las primeras células vivas que entran en contacto con sustancias aplicadas tópicamente. El uso de células HaCaT (inmortalizada, no tumorigénica) como modelo proporciona un suministro casi ilimitado de células idénticas, lo que garantiza una alta reproducibilidad intra e interlaboratorio (EURL ECVAM, 2018b). Así mismo, han logrado demostrar que la citotoxicidad *in vitro* en HaCaT y los datos *in vivo* de humanos para una serie homóloga de tensoactivos aniónicos están fuertemente correlacionadas (Ward et al., 1998; Wilhelm et al., 2001).

Aunque en la actualidad existen modelos más complejos que simulan de manera más certera las características de la piel (modelos organotípicos RhE –epidermis reconstituida humana), es difícil acceder a estas tecnologías en países como el nuestro debido a las implicaciones logísticas (transporte desde USA o Brasil y efectos del tiempo sobre la viabilidad del tejido, entre otras) y los altos costos asociados.

Los cambios morfológicos celulares son útiles para valorar las lesiones que pueden ocurrir en los tejidos. Si bien en sistemas completos la irritación ocurre por cambios inflamatorios incipientes (Monteiro-Riviere et al., 2011) (aumento de permeabilidad vascular, vasodilatación, migración celular), en sistemas de piel aislada podrían observarse algunas alteraciones específicas en las capas celulares (pérdida de células, degeneración hidrópica, entre otros). Es necesario formular otras posibles alternativas que apliquen bajo nuestras condiciones, de esta manera valorar cambios histológicos de pieles expuestas en ensayos de permeación dérmica (ver más adelante), puede contribuir a disponer de alternativas más apropiadas.

2.6 Irritación ocular

La localización del ojo y su anatomía lo predispone a la exposición a contaminantes, polución y sustancias vehiculizadas en productos que se aplican en el área del rostro, incluyendo PC y PCP. El daño a este importante órgano puede conducir a una serie de eventos adversos llegando incluso a la ceguera si se produce un daño irreversible. La preocupación social por la evaluación de la seguridad de productos y materiales que pueden entrar en contacto con el ojo empezó en 1933 cuando una mujer de 38 años quedó ciega luego de aplicar en sus pestañas y cejas una tintura que contenía *p*-fenilenediamina, una sustancia con potencial para causar blefaritis y queratoconjuntivitis tóxica (ICCVAM, 2006).

La prueba de Draize en 1944 donde se exponía el ojo de un conejo albino a la sustancia de interés, fue el primer método para evaluar este resultado, debido a la similitud del ojo del lagomorfo con el ojo humano. Consistía en depositar una cantidad de la sustancia en el saco conjuntival y se procedía a observar durante 21 días posibles efectos adversos sobre la córnea, la conjuntiva y el iris. Este método permite identificar daños reversibles e irreversibles y categorizar la sustancia de acuerdo con la severidad del daño producido (ICCVAM, 2006).

Recomendaciones acerca del bienestar animal, el costo y tiempo de desarrollo del test descrito por Draize, la reproducibilidad y el interés científico para entender el daño ocular a nivel tisular y celular condujeron el desarrollo de nuevas metodologías *in vitro* o *ex vivo* organotípicas como ICE (ojo aislado de pollo), BCOP (permeabilidad y opacidad corneal bovina), HET-CAM (prueba de la membrana corioalantoidea de huevo de gallina), citotoxicidad sobre células epiteliales corneales de conejo (SIRC) y sobre tejidos 3D (RhCE) (Takeuchi y Kwon, 2017).

2.6.1 Métodos alternativos de evaluación

2.6.1.1. HET-CAM

La membrana corioalantoidea (CAM) es una membrana respiratoria vascularizada que rodea el embrión de pollo dentro del huevo, está compuesta de una capa ectodérmica que consiste de un epitelio con un espesor de dos o tres hileras de células; una capa mesodérmica, compuesta de tejido conectivo y una capa endodérmica. Los vasos sanguíneos que están presentes en la capa mesodérmica de la CAM contienen eritrocitos y leucocitos que se cree están involucrados

en la respuesta inflamatoria que se produce luego de un estímulo externo. Se asume que los efectos agudos inducidos por una sustancia de prueba en los pequeños vasos sanguíneos y las proteínas de este tejido, son similares a los efectos que se pueden apreciar en el ojo de un conejo tratado, la desnaturalización de proteínas (observada como coagulación) se propone como un indicador de efectos en las células epiteliales de la CAM y las alteraciones en los vasos sanguíneos de la CAM son predictores de la toxicidad total y el daño conjuntival en el ojo (ICCVAM, 2006).

La comparación de la CAM con las estructuras del ojo indica una alta similitud con la conjuntiva, pues ambas estructuras son membranas mucosas que contienen un sistema vascular funcional. Sin embargo, la CAM es mucho más delgada que la conjuntiva y contiene una capa ectodérmica que es más primitiva. A diferencia de los métodos de prueba organotípicos (ICE y BCOP), las respuestas corneales como opacidad e hinchazón no se evalúan en el método de prueba HET- CAM (ICCVAM, 2006).

Se debe aclarar que las respuestas de irritación observadas en la CAM y la conjuntiva son diferentes. La irritación conjuntival típicamente conduce a la infiltración de neutrófilos y acumulación de macrófagos, mientras que la irritación de CAM conduce a la muerte celular en el área del daño. Se propone que las diferencias anatómicas y la relativa madurez del sistema inmune en el huevo (y, por lo tanto, en la CAM) contribuyan a estas diferentes respuestas; además no contempla la reversibilidad del daño y posibles efectos sistémicos (ICCVAM, 2006).

2.6.1.2. Lisis de globulos rojos

La prueba RBC (Red Blood Cells, por su sigla en inglés) se desarrolló para evaluar las reacciones celulares iniciales a la irritación causada por ciertos químicos. Algunos agentes químicos irritantes (principalmente surfactantes) causan daños a las membranas plasmáticas celulares y desnaturalizan varios tipos de proteínas. En consecuencia, los agentes no irritantes no causarán estas reacciones. Dichas reacciones, pueden correlacionarse con los eventos iniciales en la irritación del tejido ocular que conducen a respuestas inflamatorias y cambios en la conformación de la proteína, como los que ocurren con la opacidad de la córnea después del contacto con productos químicos (Pape et al., 1999).

Algunos estudios (Pape y Hope, 1987; 1990) mostraron que cualquier sustancia de prueba que cause hemólisis produce invariablemente cierto grado de irritación ocular en la prueba ocular *in vivo*. Se encontró que los puntos finales CH₅₀ (concentración de la sustancia que induce la lisis del 50% de los eritrocitos) y D-low (concentración evaluada más baja que muestra evidencia de denaturalización) están correlacionados inversamente con los índices de irritación de la prueba sobre conejo, mientras que D-max esta positivamente correlacionado. La clasificación de los compuestos por los puntos finales de la hemólisis y la desnaturalización de la oxihemoglobina, en particular, cuando se emplea la relación lisis/desnaturalización (relación L/D), se correlaciona significativamente con las clasificaciones de irritación ocular *in vivo*.

2.7 Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo es la última etapa de la evaluación del riesgo, en la que se integra la información sobre la toxicidad obtenida en la evaluación dosis-respuesta y los resultados de evaluar la exposición a un agente químico determinado (Kapoor y Saraf, 2008). La caracterización del riesgo permite obtener un punto de partida sobre la naturaleza y el alcance de ese riesgo. En esta fase del análisis, en la medida de lo posible, se emite un dictamen cuantitativo para establecer una exposición segura. Es además una de las primeras herramientas para comunicar los resultados de la evaluación del riesgo a las personas encargadas de su manejo, a los tomadores de decisiones, a los comunicadores y al público en general.

El uso de los PC y PCP supone una exposición considerable en la vida moderna; se estima que una mujer emplea en promedio 12 productos diariamente (EWG's Skin Deep, 2019). La variedad de materias primas usadas en estos productos es limitada, así, por ejemplo, muchas moléculas como sistemas preservantes y emulsificantes son comunes a múltiples formulaciones; de esta manera la cantidad y vía de exposición a este tipo de ingredientes toma especial importancia dentro de la caracterización del riesgo para cosméticos. El cálculo de la dosis de exposición sistémica (SED) tiene en cuenta la cantidad de producto cosmético terminado que un ser humano promedio se aplica diariamente, la concentración de la sustancia en el producto cosmético terminado, la absorción dérmica de esa sustancia en particular y el valor medio del peso corporal humano, tal como se muestra en la ecuación 1 (SCCS, 2015).

$$SED = A \left(\frac{mg}{kg} \right) \times \frac{C (\%)}{100} \times \frac{DA_p (\%)}{100} \quad (2.1)$$

Donde A: exposición diaria estimada, C: concentración de sustancia en producto (el 5% recomendado por el fabricante) y DA_p : absorción cutánea.

Consecuentemente, SED de un ingrediente cosmético es la cantidad esperada que entra a la circulación (y por lo tanto está disponible sistémicamente) por kg de peso corporal y por día. Se expresa en mg/kg de peso corporal/día (Kapoor y Saraf, 2008).

2.8 Tensoactivos

Los agentes activos de superficie (surfactantes) o tensoactivos, son un grupo de moléculas con características anfífilas que tienen la habilidad de modificar la interfase entre sustancias inmiscibles debido a que se orientan según su afinidad entre las dos fases opuestas. Así, la porción polar (hidrofílica) de la molécula surfactante se orienta hacia la fase más polar, de manera similar lo hace la porción no polar (hidrofóbica), por lo tanto, se forma un puente entre las dos fases (Rieger, 1997).

Como regla, un surfactante es soluble en al menos una de las fases en contacto y puede desempeñar varias funciones dentro de una formulación. Son ampliamente empleados para la creación de muchos sistemas heterodispersos como suspensiones y emulsiones; además son esenciales durante el proceso de fabricación y cumplen funciones en el mantenimiento de la estabilidad física de sistemas termodinámicamente inestables (Rieger, 1997). En la fabricación de medicamentos y cosméticos, criterios como seguridad, olor, color y pureza, influyen sobre la elección del sistema emulsificante (Paeratakul, 2002).

Los surfactantes pueden ser clasificados según su funcionalidad y la naturaleza química de su porción hidrofílica e hidrofóbica. PCPC (Personal Care Products Council, por sus siglas en inglés) en el Manual de Ingredientes Cosméticos clasifica estas moléculas en seis categorías funcionales: agentes limpiadores, emulsificantes, boosters espumantes, hidrotrópos, estabilizantes y agentes de suspensión. Pero la clasificación más útil y ampliamente aceptada está basada en la naturaleza de los grupos hidrofílicos: aniónicos, catiónicos, anfóteros zwitteriónicos) y no iónicos (Paeratakul, 2002).

- Surfactantes aniónicos: contienen una cabeza con un grupo polar que tiene una carga negativa y es ligeramente ácida, neutra o alcalina en solución acuosa. Los grupos funcionales más importantes dentro de esta categoría son los carboxilatos, sulfatos, sulfonatos y fosfatos.
- Surfactantes catiónicos: debido a la carga positiva que llevan en su cabeza polar, son usados como antiestáticos en los acondicionadores capilares y agentes bactericidas; dentro de este grupo se comprenden las alquilamidas, compuestos de amonio cuaternario, alquilamidas etoxiladas y cuaternarias esterificadas.
- Surfactantes anfóteros: Poseen una carga positiva o negativa que es determinada por el pH de la solución y muestra su forma zwitteriónica en el punto isoeléctrico (pH intermedio). En condiciones ácidas prevalece por lo general la forma catiónica, sin embargo, bajo condiciones extremas tienden a perder sus propiedades. Las alquilaminas alquiladas y aminoácidos sustituidos alquil pertenecen a este grupo.
- Surfactantes no iónicos: son moléculas que no se disocian en solución acuosa, tienen buena compatibilidad con la piel y los ojos, y dependiendo del tipo pueden ser agentes espumantes débiles o moderados. Sirven como agentes limpiadores (usualmente combinados con surfactantes aniónicos) pero generalmente como emulsificantes. Dentro de esta categoría se pueden encontrar alcoholes grasos, ácidos grasos etoxilados, sorbitan y ésteres de sorbitol, entre otros (Lukic et al., 2016).

El uso de este tipo de materiales ha sido ampliamente cuestionado debido a la fuerte evidencia de los efectos tóxicos principalmente sobre el ambiente, particularmente su acumulación en fuentes hídricas. Los surfactantes son uno de los principales componentes (10 – 18%) de una amplia gama de productos usados rutinariamente en la industria y los hogares, los catiónicos son los que tienen la menor toxicidad crónica y subcrónica sobre organismos acuáticos; mientras que los aniónicos y no iónicos evidencian efectos deletéreos desde una concentración de 0.1 g/L (Lewis, 1991).

Los surfactantes aniónicos a los que se exponen los humanos vía dérmica se dirigen principalmente al estrato córneo afectando individuos con piel sensible, lo que produce dermatitis y úlceras aftosas. Es probable que la toxicidad sistémica de los tensoactivos aniónicos sea relativamente baja en vertebrados superiores a medida que aumenta el peso molecular posiblemente debido a una menor adsorción en el intestino. Por lo tanto, no es

probable un efecto tóxico agudo atribuible a los tensoactivos aniónicos, pero un efecto crónico puede ocurrir en humanos, ya que una dosis regular de exposición es de aproximadamente 5 mg/persona. Estos compuestos pueden hallarse en agua potable, detergentes, pasta de dientes y alimentos. Se ha hallado que algunos surfactantes no iónicos anestesian el globo ocular y, por lo tanto, las combinaciones de no iónicos con aniónicos harían que muchos champús sean suaves para los ojos (Rebello et al., 2014).

A pesar de que este tipo de moléculas no tiene una alta persistencia en el ambiente sus tasas de transformación/remoción son altas y se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Becerril, 2009). Es por lo que se han catalogado como “contaminantes emergentes”, es decir, que previamente no habían sido reconocidos como tal y su presencia en el ambiente no es nueva, pero si lo es la preocupación por sus efectos (Petrović, 2003).

2.8.1 Biosurfactantes

Este tipo de surfactantes de origen natural son clasificados dentro de una categoría especial dado su origen microbiano (levaduras, hongos o bacterias). Poseen algunos beneficios en comparación con los tensoactivos sintetizados químicamente o derivados de la industria petroquímica, entre ellos menor toxicidad, mayor biodegradabilidad, mayor compatibilidad con el medio ambiente, concentración micelar crítica (CMC) más baja, actividad constante a pH o temperaturas extremas, diversas actividades biológicas como antimicrobianos, antivirales y hemolíticos.

Los microorganismos usan una cantidad de fuentes de carbono y energía para su crecimiento, la combinación de dichas fuentes de carbono con sustratos insolubles facilita la difusión intracelular y la producción de diferentes sustancias. La literatura describe a bacterias de los géneros *Pseudomona* y *Bacillus* como los mejores productores de biosurfactantes, empero, muchos biosurfactantes de origen bacteriano son considerados inadecuados para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a la naturaleza patogénica de las bacterias que lo originan. Es por lo que se ha estimulado el uso de levaduras en la investigación como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*; cuyos residuos son “generalmente considerados como seguros”, “GRAS” (Generally Regarded as Safe, por sus siglas en inglés), por lo tanto, no implican riesgos de toxicidad y seguridad (Santos et al., 2016).

La manufactura a gran escala de biosurfactantes y especialmente de ramnolípidos se ha establecido solo hasta los últimos años, dados los altos costos de producción y la dificultad en el hallazgo de cepas de microorganismos no patogénicas que permitan la obtención de un producto final seguro, no obstante, es una industria que a la fecha cuenta con 17 empresas productoras y 42 patentes de proceso de producción con variados microorganismos. Esta industria que ha tenido un crecimiento del 4.3% entre 2014 y 2020, se postula como un mercado de 23 millones de dólares para 2023, (Sekhon et al., 2014; Santos et al., 2016).

Estas moléculas poseen un componente lipídico que es usualmente una cadena hidrocarbonada de un ácido graso (Brown, 1991). Los tensoactivos biológicos se clasifican según su estructura química en: glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, fosfolípidos (biosurfactantes de bajo peso molecular) y surfactantes poliméricos (alto peso molecular) (Lukic et al., 2016; Vecino et al., 2017). Los fosfolípidos, aunque presentes en todos los organismos, son raramente excretados como productos extracelulares, los glicolípidos y lipopéptidos son producidos por diferentes microorganismos (Tabla 2.5) y suelen ser liberados al medio de cultivo en cantidades significativas (Brown, 1991).

Glicolípidos: son los surfactantes microbianos más estudiados. Estructuralmente, son ácidos alifáticos o hidroxialifáticos de cadena larga en combinación con restos de carbohidratos. Sobre la base de la naturaleza de la porción carbohidrato, los glicolípidos pueden subdividirse en lípidos ramnosa (ramnolípidos), trehalosa, soforosa (soforolípidos), celobiosa, manosileritritol (MEL), lipomananos-manitoles, lipomananos y lipoarabinomananos, diglicósidos diglicéridos, monoacilglicerol y galactosil-diglicerido. Dentro de este grupo, los ramnolípidos, soforolípidos y los MEL son los tensoactivo más investigados y se prevé su aplicación prospectiva en la producción de cosméticos (Lukic et al., 2016; Vecino et al., 2017).

Ramnolípidos: son surfactantes aniónicos (Jensen et al., 2011) que consisten en una o varias moléculas del azúcar L-(+)-ramnosa unido a una o dos moléculas de ácido β -hidroxidecanoico (Figura 2.6), tienen características aniónicas y se ha demostrado su naturaleza hidrofílica (Nguyen et al., 2008, 2009) y HLB (balance hidrófilo-lipofílico) entre 22 y 24 (Xie et al., 2005). Los ramnolípidos pueden producirse mediante cepas de *Pseudomonas* (p. ej., *P. aeruginosa*). Además, pueden producirse en diferentes formas, tales como mono-ramnolípidos y di-ramnolípidos (Lukic et al., 2016; Lourith et al., 2009).

Tabla 2.5: Biosurfactantes producidos por algunos microorganismos (Brown, 1991; Jiménez et al., 2010; Santos et al., 2016)

Organismo productor	Clase de biosurfactante					
	Glicolípidos	Surfactantes poliméricos	Lipopéptidos	Ácidos grasos	Surfactantes particulados	Fosfolípidos
Bacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Nocardia</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurella</i> sp.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Bacillus sterothermophilus</i> , <i>Halomonas eurihalina</i> , <i>Mycobacterium thermoautotrophium</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Gluconobacter cerineus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Capnocytophaga</i> sp., <i>Corynebacterium insidibasseosum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Cyanobacteria</i> , <i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Acinetobacterium</i> sp., <i>Corynebacterium lepus</i>
Hongo	<i>Candida antartica</i> , <i>Candida apícola</i> <i>Candida bastitae</i> , <i>Candida bogoriensis</i> , <i>Candida bobicola</i> , <i>Candida ishiwadae</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i> , <i>Ustilago maydis</i>	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida utilis</i>	<i>Candida lipilytica</i> , <i>Streptomyces sioyaensis</i>	<i>Penicillum spiculisporum</i> , <i>Talaromyces trachyspermum</i>		<i>Aspergillus</i>

Soforolípidos: son producidos por especies de *Candida* (por ejemplo, *C. bombicola*), *Wickerhamiella domercqiae*, entre otras. Consiste en un disacárido soforosa (2-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranososa) unido a un ácido graso terminal o subterminal, ensamblados por un enlace β -glicosídico. El extremo carboxílico terminal puede ser un ácido libre o esterificado intramolecularmente en su forma lactónica en las posiciones 4'', 6' o 6''. La mezcla derivada obtenida está compuesta de moléculas homólogas con diferentes longitudes de cadena de ácidos grasos, estereoisómeros así como patrones de lactonización y acetilación (Lourith et al., 2009).

Los glicolípidos mantienen su actividad a altas concentraciones salinas y a través de un amplio rango de temperaturas, pero se inestabilizan a pH superiores a 7.5 entrando en hidrólisis. Dentro de las múltiples funciones se emplean en la industria cosmética como: (i) peeling y despigmentantes, ya que remueven las capas superficiales del estrato córneo, (ii) tratantes de la celulitis pues estimulan la síntesis de leptina en adipocitos y (iii) agentes antiedad gracias a la estimulación del metabolismo de fibroblastos y la neosíntesis de colágeno, así como la inhibición de radicales libres. A pesar de la amplia funcionalidad que tienen estas moléculas, su uso ha sido reducido dada la pobre solubilidad a pH<5 (Lukic et al., 2016; Lourith et al., 2009).

La aplicación práctica de los biosurfactantes está limitada por sus costos de producción y propiedades como agentes de superficie en relación con la competencia con los tensoactivos sintetizados químicamente. Sin embargo, tienen una aplicación potencial tanto en sectores ambientales y de recuperación de crudo como en el área agrícola, farmacéutica, de alimentos y cosméticos. Una aplicación directa de los biosurfactantes está basada en su actividad antimicrobiana, la cual es estimada de acuerdo con los valores de la menor concentración inhibitoria como agente antimicrobiano (MIC - Minor Inhibitory Concentration, por sus siglas en inglés). En la agricultura, los biotensoactivos son empleados debido a su actividad insecticida y herbicida, por ejemplo, los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas syringae* son usados en el biocontrol de *Canada thistle*, maleza invasora de pastos y cultivos (Jiménez et al., 2010).

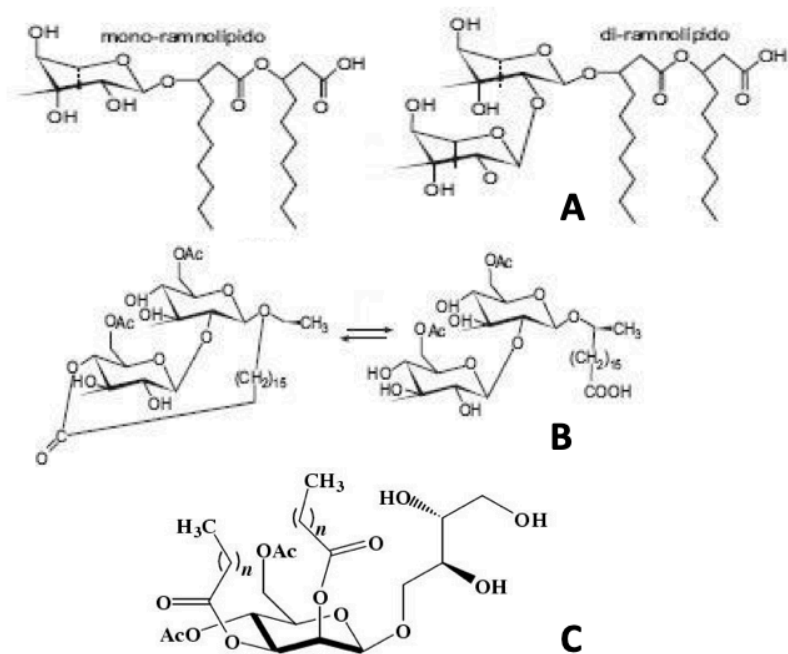


Figura 2.6: Estructura general de biosurfactantes. A: ramnolípidos. B: lípido de manosileritritol. C: Soforolípidos en equilibrio con su forma lactona (Jiménez et al., 2010).

En el sector ambiental los biotensoactivos producidos por bacterias del género *Bacillus* han sido ocupados para emulsificar y dispersar en fase acuosa pesticidas de solubilidades bajas como los organoclorados. A nivel industrial, los heteropolisacáridos de *Macrocystis pirifera* y *Azotobacter vinelandii* han sido utilizados como dispersantes en la producción de cerámica. El espectro de aplicación de los biosurfactantes es muy amplio, e incluso han encontrado un uso en el campo de la biorremediación y mejoramiento en la extracción de crudo. Ejemplo de esta actividad son los productos utilizados por la empresa Rhamnolipods Co., que utiliza algunos productos para remediación como son Rhamnolipids Biorem 80®, Esludger 60® y Biorem 70® (Jiménez et al., 2010).

2.8.2 Biosurfactantes en la industria cosmética y farmacéutica

Los biosurfactantes se usan de la misma manera que los tensoactivos sintetizados químicamente empleándose en detergencia, emulsificación, humectación, espumación, dispersión, solubilización de sustancias hidrófobas o para modificación de superficies, entre otras posibles funciones. La actividad emulsificante es probablemente la propiedad más

importante de los biosurfactantes en la formulación de cosméticos. Es importante notar que los biosurfactantes de bajo peso molecular reducen la tensión superficial en las interfaces aire/agua y la tensión interfacial en las interfaces aceite/agua (O/W), mientras que los biosurfactantes de alto peso molecular son más eficaces en la estabilización de emulsiones agua/aceite (W/O). Uno de los problemas más difíciles relacionados con el uso de surfactantes de base química en formulaciones cosméticas, es su potencial para causar irritaciones de la piel y reacciones alérgicas, ya que pueden interactuar con proteínas, eliminar lípidos de la superficie epidérmica desorganizando la estructura intercelular y también afectar a las células vivas de la piel; estos efectos nocivos pueden evitarse potencialmente o reducirse mediante el uso de biosurfactantes (Vecino et al., 2017).

Adicional a los beneficios ya contemplados, los biosurfactantes poseen una buena serie de actividades biológicas como el efecto bacteriostático, bactericida, estimulación del sistema inmune, inhibición del crecimiento de tumores, lisis celular (hemólisis), patogenicidad en plantas, efectos en la migración de neutrófilos, acción a nivel del sistema respiratorio (actividad anti-asmática), efectos sobre el sistema digestivo, propiedades antimicóticas y fungicidas (inhibición de la síntesis de la pared celular y actividad enzimática) (Gharaei- Fathabad, 2011; Santos et al., 2016).

Algunos autores refieren que los biosurfactantes poseen importantes características que los hacen fuertes candidatos a emplearse en formulaciones cosméticas y medicamentosas como su balance hidrófilo-lipófilo, su rendimiento iónico y su CMC (concentración micelar crítica, medida de eficiencia que establece cuál es la concentración más baja de biosurfactante que produce la máxima reducción de la tensión superficial del agua), entre otros. Los valores de CMC indicados en la literatura muestran que los glicolípidos, ramnolípidos y lipopéptidos (surfactina) exhiben valores bajos. Patowary et al. (2016) hallaron un ramnolípido de *P. aeruginosa* SR17 con una CMC de 110 mg/L utilizando suero de queso hindú como medio de producción. Ma et al. (2016) aislaron a partir de suelos contaminados con petróleo, una cepa *P. aeruginosa* DN1 que produce un biosurfactante con una CMC de 50 mg/L. Sin embargo, es importante notar que los valores de CMC determinados para un biosurfactante específico pueden variar con el grado de purificación alcanzado durante el proceso de extracción (Vecino et al., 2017).

El valor HLB permite predecir la capacidad emulsificante del biosurfactante. Dependiendo de ello, una molécula puede actuar como emulsionante, agente humectante o agente antiespumante, entre otros. Los biosurfactantes, con mayor carácter lipófilo, presentan valores bajos de HLB, mientras que los biosurfactantes hidrófilos poseen altos valores de HLB. Por lo tanto, los biosurfactantes con mayor solubilidad en agua serán mejores estabilizantes de emulsiones O/W, mientras que los biosurfactantes con gran solubilidad en aceite serían mejores estabilizantes de emulsiones W/O. Las emulsiones W/O, con valores HLB entre 1 y 4, son preferibles para aplicaciones dermatológicas, ya que la película lipídica sobre la piel favorece los ingredientes activos solubles en aceite. Estas formulaciones cosméticas tienen una acción protectora y un carácter oclusivo. Sin embargo, las emulsiones O/W, con valores HLB entre 8 y 16, son más apreciadas por los consumidores debido a su menor sensación grasa (Vecino et al., 2017).

La información disponible en la literatura con respecto a los valores de HLB de los biosurfactantes es escasa. Autores han reportado que un glicopéptido producido por *Candida antarctica* SY16, a bajas concentraciones pudo emulsionar aceite vegetal, siendo su valor HLB 8,8 (Kim et al., 2002). Los valores HLB de estos soforolípidos están entre 13 y 15, lo que es una propiedad deseable para la preparación de ciertas formulaciones cosméticas y de cuidado personal. Además, el comportamiento iónico de los biosurfactantes es también un factor importante si se prevé su aplicación en formulaciones cosméticas. Entre los tensoactivos, aquellos aniónicos tienen las mayores propiedades humectantes, espumantes y emulsionantes en comparación con los tensoactivos catiónicos y no iónicos. Sin embargo, los estudios relacionados con la naturaleza iónica de los tensoactivos mostraron que los aniónicos son más irritantes que los no iónicos y aún que los anfóteros. Los tensoactivos catiónicos han mostrado excelentes propiedades antibacterianas, así como buena capacidad emulsionante, a la fecha pocos estudios han evaluado la naturaleza iónica de los biosurfactantes (Vecino et al., 2017), sin embargo, se ha logrado determinar que a pesar de la buena biodegradabilidad de los surfactantes catiónicos estos tienen un nivel importante de toxicidad ambiental incluso a bajas concentraciones, esto mismo ocurre con algunos de naturaleza no iónica como los alquil fenil etoxilados (Scott y Jones, 2000). Los surfactantes aniónicos son ampliamente aceptados como irritantes dérmicos potentes, los catiónicos son ligeramente más seguros que los anteriores, pero más citotóxicos, mientras que se considera que el potencial irritante de los no iónicos es el

más bajo, no obstante, esta categorización no permite hacer una determinación exacta del potencial irritante y citotóxico de cada surfactante (Effendy y Maibach, 1995).

Algunos autores han evaluado la aptitud de los ramnolípidos como potenciadores de la absorción molecular a través de monocapas de células Caco-2 (células de adenoma colorectal) como modelo de membrana epitelial intestinal y respiratoria, hallando que estos biosurfactantes son capaces de incrementar la permeabilidad de moléculas pequeñas (Jiang et al., 2013) y activos macromoleculares (Perinelli et al., 2017) dependiendo de su concentración y sugieren que el aumento de la permeabilidad se debe a la apertura reversible de las proteínas de unión estrechas del epitelio (ZO-1, ocludina, claudina-1) y no a su degradación.

Adicionalmente en estudios de proliferación realizados por Stipcevic y cols (2005, 2006) con un di-ramnolípidos se demostró un comportamiento diferencial sobre fibroblastos y queratinocitos humanos, donde se inhibía la proliferación de los primeros, y estimulaba el crecimiento de los segundos, mostrando potencial aplicación para la cicatrización y el tratamiento de psoriasis, enfermedad en la que es deseable la inhibición de la proliferación de fibroblastos. Se plantea la posibilidad de emplear di-ramnolípidos como aceleradores de la cicatrización de heridas y quizá como adyuvantes en la remodelación de heridas crónicas, superando los defectos asociados al fracaso de su curación. Los efectos biológicos demostrados del di-ramnolípidos, en cultivos de células cutáneas y en modelos animales de quemaduras de espesor total, señalan el posible uso de di-ramnolípidos como agente terapéutico para el tratamiento de úlceras por presión, diabéticas y de estasis venosa.

Jiang et al. (2013) demostraron que los ramnolípidos poseen menor actividad hemolítica, sin embargo, no se evidenciaron diferencias en el perfil citotóxico sobre Caco-2 evaluando la viabilidad celular a través de la lisis de membrana (captación de rojo neutro). Chrisnova et al. (2013) evaluaron la citotoxicidad de un ramnolípidos obtenido de la cepa BN10 de *P. aeruginosa* sobre fibroblastos de embriones múrinos 3T3 BALB/c mediante la liberación de rojo neutro (3T3 NRU test), obteniendo evidencia de baja toxicidad. Además, se demostró que estas moléculas no exponen un comportamiento citotóxico selectivo hacia líneas tumorales (Jiang et al., 2014).

Finalmente, estudios ecotoxicológicos realizados a mono-ramnolípidos indican que en general poseen baja toxicidad aguda sobre *Daphnia magna*, algunas concentraciones de efectos observados estuvieron por debajo de las concentraciones tóxicas de los tensoactivos químicos.

Los ramnolípidos no inducen mutaciones, ni sustituciones de pares de bases, ni mostraron un potencial de alteración estrogénica en las condiciones experimentales (Johann et al., 2016). Sin embargo, aún está por estudiarse el efecto tóxico de las mezclas de mono y di-ramnolípidos (muy comercializadas); además, se debe considerar la biodisponibilidad y la bioacumulación de estas moléculas emergentes.

3. Materiales y Métodos

3.1 Surfactantes valorados

3.1.1 Ramnolípidos

Para todos los ensayos se empleó una mezcla acuosa de ramnolípidos (RL) conocida comercialmente como Rheance One (lote 17FT11-35-01) proporcionada por Evonik Corporation (Essen, Alemania), obtenida de una cepa de *Pseudomonas putida* genéticamente modificada compuesta en un 90% del di-ramnolípidos Rha₂-C₁₀-C₁₀ (CAS 4348-76-9) (Figura 3.1) de pH: 5.6 – 9.0 y preservada con 0.6% de benzoato de sodio, soluble en medio acuoso, organolépticamente identificada como un líquido amarillo de apariencia viscosa y olor característico.

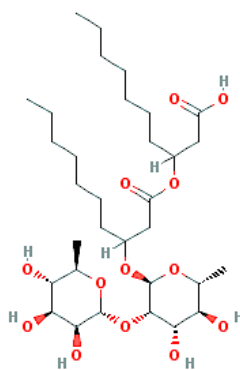


Figura 3.1: Estructura química de Rha₂-C₁₀-C₁₀ (Chemspider, 2018)

3.1.2 Otros surfactantes

A fin de comparar el perfil de seguridad de los ramnolípidos en algunas de las pruebas desarrolladas (citotoxicidad comparativa y HET-CAM) se evaluaron surfactantes de uso tradicional en la industria cosmética como cocamidopropil betaína (CAPB) (Sigma Aldrich), polisorbato 20 (Merck) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich). Para las pruebas de seguridad en las que no se evaluaron estos surfactantes, la información obtenida del ramnolípidos se comparó con perfiles de seguridad de tensoactivos cosméticos, reportados en la literatura.

3.2 Permeación dérmica

Se siguió el protocolo descrito en OECD 428, 2004

3.2.1 Obtención de la muestra de piel

Cuatro unidades (200g) de orejas de cerdo adulto procedentes de diferentes individuos fueron obtenidas de la planta de beneficio de Zipaquirá (Cundinamarca). Cuatro horas después del sacrificio, las orejas fueron cuidadosamente lavadas con agua osmotizada para retirar excesos de suciedad y sangre, posteriormente se retiraron las vellosidades empleando tijeras para no dañar el estrato córneo, finalmente se separó la piel del cartílago con ayuda de un escalpelo y se monitoreó integridad y ausencia de lesiones mediante observación con estereomicroscopio. La piel separada del cartílago fue envuelta completamente en papel aluminio y almacenada a -30°C durante 5 días.

Con el fin de valorar posibles alteraciones histológicas que contribuyan con el perfil de irritación dérmica se evaluaron los cambios histológicos de una muestra adicional de piel procedente del flanco de un cerdo de 4 semanas de nacimiento, extraída inmediatamente después del sacrificio (piel fresca y viva) y transportada de DMEM para preservar su viabilidad. Fue sometida al proceso de limpieza y eliminación de vellosidades descrito anteriormente. Adicional se hicieron 6 enjuagues con agua a 30°C durante 10 segundos con el fin de separar la hipodermis. Esta muestra fue obtenida en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de

Colombia ubicado en el kilómetro 14 de la carretera central de Occidente municipio de Mosquera (Cundinamarca).

3.2.2 Equipo de permeación

Se emplearon celdas de Franz Siliser® con un volumen interno y área de difusión efectiva de aproximadamente 10 mL y 1.3 cm² respectivamente, con chaqueta de recubrimiento y recirculación de agua para mantener la temperatura constante y homogénea en todos los dispositivos, empleando un baño termostático y agitación constante (Figura 3.2).

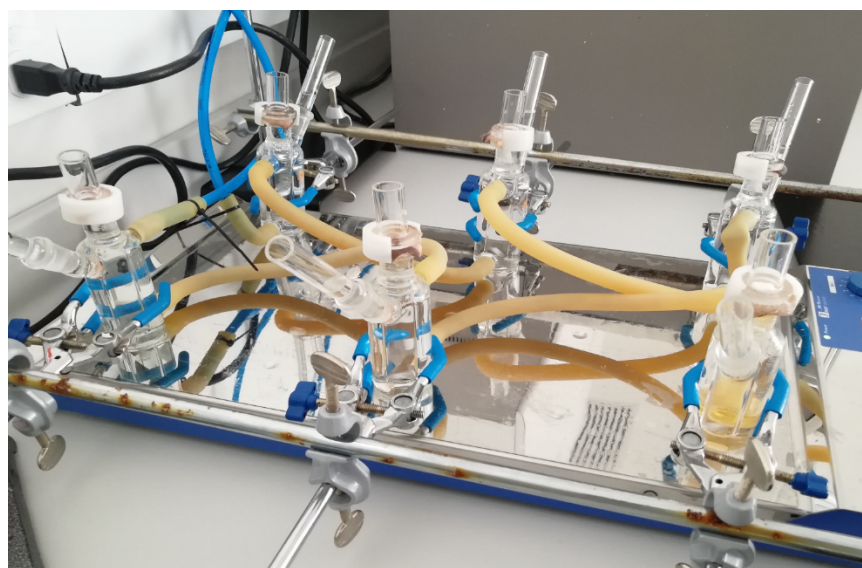


Figura 3.2: Montaje de celdas de Franz

3.2.3 Perfil de permeación

Una vez se descongeló la piel a temperatura ambiente, se cortaron círculos de aproximadamente 2 cm², de manera que cubrieran completamente el área superficial del compartimento receptor. Evonik Corporation recomienda el uso del ramnolípido en productos de cuidado personal (champús y jabones corporales) a una concentración máxima del 5% en fórmula; por lo tanto, el material fue evaluado a esta concentración como una solución acuosa preparada en agua destilada y osmotizada. Se hicieron 3 repeticiones usando una solución con cafeína al 5% como control positivo del ensayo, donde se espera un alto perfil de permeación.

Se empleó una solución de buffer de fosfatos (PBS) a $\text{pH } 7.2 \pm 0.1$ como líquido receptor que fue previamente puesto en las celdas de Franz conectadas al montaje (Figura 3.2), permitiendo su precalentamiento ($32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) antes de colocar la piel. Se dio un tiempo de estabilización piel-fluido de 20 – 30 minutos. Posteriormente, se monitoreó la integridad del tejido midiendo la resistencia eléctrica transcutánea (TER) con un voltímetro (Millipore Multicell®-ERS) (Davies et al., 2004) descartando los tejidos que tuvieran valores por fuera del rango de $5.1 \pm 0.8 \text{ kW}$. Finalmente, se depositaron $250 \text{ } \mu\text{L}/\text{cm}^2$ de la mezcla de ramnolípidos al 5% con una dosis finita de las moléculas de interés de $12.5 \text{ } \mu\text{g}$, cantidad que garantiza la condición sink en el compartimento receptor pues la solubilidad máxima en medio acuoso determinada fue de $500 \text{ } \mu\text{L}/\text{mL}$. Se cerró el sistema y se hicieron muestreos del compartimento receptor en los montajes de piel congelada, a las 0.5, 1, 4, 8 y 24 horas, estos tiempos de muestreos fueron definidos teniendo en cuenta el tipo de uso para el que se prevé la materia prima (cosméticos enjuagables y no enjuagables). El sistema se mantuvo en agitación constante durante todo el periodo de exposición a la máxima velocidad proporcionada por la plancha de agitación, de manera que no se genere vórtice en el líquido, así mismo el compartimento donador fue ocluido para evitar la pérdida de masa por evaporación. Esta piel fue analizada al finalizar la exposición (24 horas), valorando el contenido de ramnolípidos en los diferentes estratos. Fueron realizadas tres repeticiones de este ensayo incluyendo las cuantificaciones correspondientes, descritas más adelante.

En las celdas de Franz donde se empleó piel viva, se muestreó el mismo compartimento a las 0.5 y 2 horas en cada tiempo, el tejido fue fijado en formol bufferado para estudio histológico (ver más adelante).

3.2.4 Tape stripping

Finalizado el estudio a las 24 horas se hicieron 3 lavados de la superficie de la piel con 2 mL de PBS para recuperar el material no absorbido y cuantificarlo, se eliminó el exceso de humedad con la ayuda de una gasa y se separó el estrato córneo de la epidermis viva mediante el método tape stripping (20 repeticiones) como una adaptación de la metodología descrita por Dabboue et al., 2015, agrupando las piezas de cinta en grupos de cinco y de manera consecutiva (1 – 5, 6 – 10, 11 – 15 y 16 – 20), este autor comprobó que con las 20 repeticiones la pérdida de agua transepidermal llega a un estado de equilibrio, lo que permite deducir que se

ha retirado todo el estrato corneo y queda expuesta la epidermis viva. Cada segmento de cinta adhesiva (3M™) con área de 4 cm² es ubicado sobre el explante de piel, haciendo presión con un aplicador durante 3 segundos. Los fragmentos de cinta fueron retirados en diferentes direcciones con una variación de 90° en cada repetición, siguiendo las recomendaciones proporcionadas en OECD GD 28 y sometidos al proceso de extracción del ramnolípido con agua destilada y osmotizada.

Finalmente, con un dermatomo SOBER (Humeca 4.SB01) graduado a 0.25 mm se separó la dermis de la epidermis y a cada fracción se le realizó la extracción con el mismo solvente, para hacer posteriormente la cuantificación del material en cada capa de la piel.

3.2.5 Cuantificación de ramnolípidos

Para hacer la cuantificación del biosurfactante se siguió la metodología descrita por Pinzón y Ju, 2009. A las muestras procedentes del compartimento receptor de la celda de Franz y el extracto acuoso procedente de las fracciones de la piel, se les ajustó el pH inicialmente a 2.3 ± 0.2 , usando HCl 0.1N, aprovechando la propiedad que tienen estas moléculas de tener un comportamiento hidrofóbico a pH inferior a 5.4. Las muestras acidificadas se extrajeron luego con un volumen cinco veces mayor de cloroformo. Se retiraron cuidadosamente 4.5 mL del extracto y se pusieron en contacto con 300 μ L de una solución de azul de metileno recién preparada de 40 μ g/mL en agua destilada. El pH de la solución acuosa de azul de metileno fue preajustado a 8.6 ± 0.2 añadiendo tampón de bórax 50 mM (~15 μ L). La mezcla se agitó vigorosamente durante 4 minutos en un vortex a 1400 rpm, y se dejó reposar por 15 minutos, la reacción ocurrida durante este proceso se describe en la Figura 3.3.

La fase de cloroformo se transfirió y la absorbancia fue medida a $\lambda=653$ nm con un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 contra un blanco de solvente. Los valores de absorbancia se analizaron como concentraciones de ramnolípidos usando una curva de calibración previamente establecida.

La curva de calibración del método se preparó empleando concentraciones entre 37.5 y 1000 ppm de la mezcla de ramnolípidos (Anexo 1), siguiendo la metodología descrita, donde cada medida (curva de calibración y muestras) fue realizada por triplicado, los resultados se reportan

como el promedio \pm DS de la mezcla de ramnolípidos en ppm. Se evaluó el desempeño de la

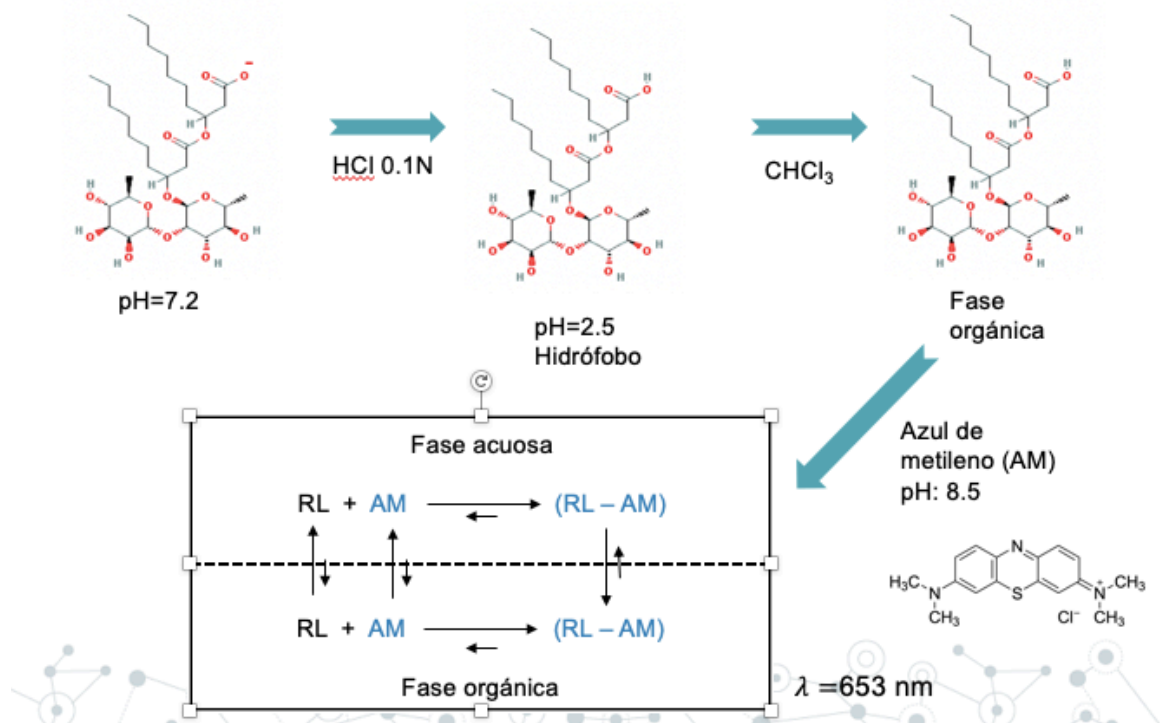


Figura 3.3: Proceso de complejación de los ramnolípidos con azul de metileno. La disminución del pH con HCl permite a los ramnolípidos manifestar sus características hidrófobas, lo cual hace que sea posible su extracción con CHCl_3 . En la fase orgánica se produce la complejación con azul de metileno, este complejo es mayormente afín por la fase acuosa donde finalmente se cuantifica a $\lambda=653 \text{ nm}$.

metodología calculando linealidad, sensibilidad, factor de respuesta, límite de detección y límite de cuantificación. La linealidad y sensibilidad se determinaron a través de un análisis de mínimos cuadrados; el factor de respuesta a través del coeficiente de variación, se calculó sobre la base de la desviación estándar de cada punto de la curva y su promedio. El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon sobre la base de la desviación estándar del blanco y corresponde a 3 y 10 desviaciones estándar del blanco, respectivamente (ICH, 2005; Thomsen et al., 2003). La Tabla 3.1 indica las características de desempeño de método.

Los resultados se muestran como la cantidad total de ramnolípidos hallada en los diferentes compartimentos (capas de piel o líquido receptor) para los casos en los que aplique, también se

expresa como el porcentaje de masa permeada a partir de la cantidad de ramnolípido dispensada en el compartimento superior (12.5 µg).

Tabla 3.1: Características de desempeño del método espectrofotométrico

Parámetro	Valor
Linealidad	99.99%
Sensibilidad	0.0010 ppm
Límite de detección	0.031 ppm
Límite de cuantificación	0.104 ppm
Coefficiente de variación	4.34%

3.2.6 Cuantificación de cafeína

Se empleó una solución acuosa de cafeína (Merck) al 5% como control positivo de permeación tal como recomienda la guía 156 de la OECD, donde lo esperado es que una cantidad cercana al 100% de la dispensada sea absorbida al líquido receptor, este ensayo se realizó por triplicado. Se cuantificó la cafeína según el método espectrofotométrico propuesto por Clarke y Macrae (1988) y Belay et al. (2008). La absorbancia fue medida a $\lambda=268$ nm y la concentración calculada a partir de una curva de calibración elaborada con el estándar de cafeína (Sigma-Aldrich) entre 3 y 1000 ppm.

3.3 Potencial de irritación dérmica

A pesar de que las pruebas con líneas celulares no reemplazan ni son concluyentes frente al potencial irritante de una sustancia son útiles para reconocer la interacción que tendrían con un sistema biológico, en este caso las células.

Se realizaron pruebas de citotoxicidad comparativas sobre queratinocitos dérmicos humanos (HaCat) y fibroblastos múrinos embrionarios (3T3 Balb/C). Realizando algunas modificaciones a las metodologías descritas en EURL ECVAM, 2018b; 2018c, que describen métodos de screening, dado que se trata de células de piel la analogía con irritación dérmica podría ser más cercana.

3.3.1 Líneas celulares

Las líneas celulares fueron obtenidas de bancos celulares (ATCC: American Type Culture Collection para 3T3 Balb/C y CLS: Cell Line Service para HaCat) mantenidas en congelación y activadas para ser cultivadas en frascos de 75 cm² bajo incubación (Thermo Scientific Series 8000WJ) a 37 °C, con 5% de CO₂ y con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de penicilina sódica - estreptomina (cada una en concentración de 10,000 U/mL).

La activación de las líneas celulares se realizó calentando el vial en baño termostático a 37 °C durante 2 min, posteriormente se re suspendió el contenido en 10 mL del medio de mantenimiento descrito antes, esta suspensión se centrifugó (Eppendorf 5702) a 125 g durante 5 minutos para separar el DMSO usado para la criopreservación. El pellet fue suspendido nuevamente en 10 mL de DMEM y sembrado en frasco de 75 cm³.

Se realizó una inspección visual con microscopio óptico (Nikon Eclipse TS100) para confirmar la identidad de las células (Figura 3.4) y descartar contaminaciones por microorganismos u otras líneas celulares eucarióticas. Una vez los frascos de cultivo alcanzaron una confluencia aproximada del 80%, las células fueron transferidas a placas de 96 pozos, cada uno con densidad de 110.000 células/mL para HaCat y 120.000 células/mL para 3T3 e incubadas durante 24 h a las mismas condiciones.

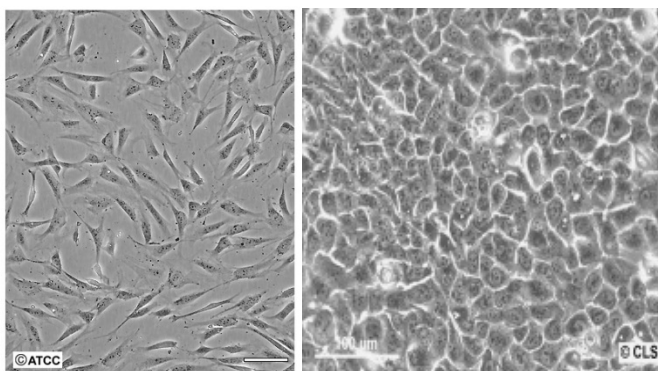


Figura 3.4: Morfología de las líneas celulares empleadas. Izquierda: 3T3, derecha: HaCat. Tomado de: ATCC, 2018 y CLS, 2018.

Transcurrido dicho tiempo, los pozos se observaron con microscopio óptico para confirmar la adhesión de las células y la convergencia adecuada a fin de iniciar el ensayo. Luego se adicionaron los surfactantes (ramnolípidos, CAPB, polisorbato 20 y SDS) a los pozos en concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 1750 y 2000 ppm cada una por triplicado y vehiculizadas en DMEM agregando un volumen de 100 μ L/pozo y empleando como control de crecimiento los pozos laterales donde se adiciona únicamente medio de cultivo. La fila A (pozos 2 al 11) fue empleada como blanco de solvente del colorante, adicionando a cada pozo 100 μ L de DMSO puro (HaCaT) o ácido acético/etanol/agua 1% (3T3). Las columnas 1 y 12 y la fila H no fueron tratadas a fin de evitar la variabilidad producida por la alta tasa de evaporación del solvente. La manera como se dispuso de los tratamientos en cada placa se ilustra en la Figura 3.5. Puesto que SDS y CAPB causaron baja viabilidad celular a las concentraciones empleadas, se realizó una curva adicional de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150 y 200 ppm, con el fin de poder calcular CI_{50} (concentración inhibitoria 50) mediante interpolación en la curva obtenida luego de un ajuste a un modelo no lineal de dosis respuesta de pendiente variable con un 95% de confianza en el paquete estadístico GraphPad Prism 8. Se realizaron en total 3 experimentos con 3 repeticiones en cada uno.

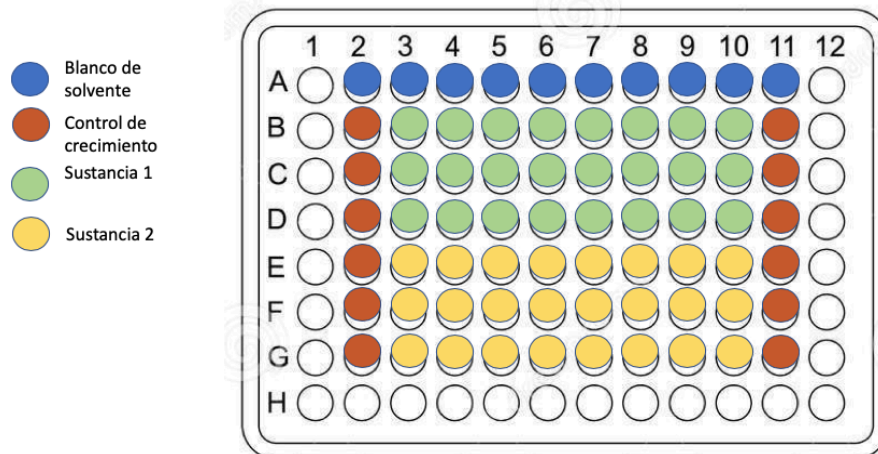


Figura 3.5: Distribución de la caja de 96 pozos en ensayo de citotoxicidad con líneas celulares HaCat y 3T3 Balb/C

3.3.2 Citotoxicidad en HaCat

Después del tratamiento con los tensoactivos, el medio se aspiró y se realizaron 3 lavados con 100 μ L de PBS por pocillo, luego se adicionaron 100 μ L de solución de MTT (0.5 mg/mL en medio de cultivo). Tras 2 h de incubación a 37 °C, se añadieron 100 μ L de DMSO puro para extraer el colorante y luego de 5 minutos en agitación continua se leyó la absorbancia (λ = 550 nm) en un lector de microplacas (Synergy HTX).

3.3.3 Citotoxicidad en 3T3 Balb/C

Se siguió la metodología descrita en el protocolo DB-ALM No. 46, donde la tinción se hizo con una solución de rojo neutro (NR) (50 mg/mL en medio de cultivo). Después de 3 h de incubación a 37°C, se lavaron las células con PBS para eliminar los excesos de colorante, añadiendo posteriormente una solución de ácido acético al 1% preparada en etanol:agua 1:1 y luego de 5 minutos en agitación continua se leyó la absorbancia (λ = 450 nm) en un lector de microplacas (Synergy HTX).

Para las dos líneas celulares se determinó la concentración de la sustancia que causaba el 50% de la muerte celular (CI_{50}) y se graficó la curva completa de citotoxicidad (supervivencia celular vs. Log concentración).

3.3.4 Aportes de la evaluación histológica de piel de cerdo

Con el fin de contribuir a la valoración del potencial irritante a través del estudio de cambios histológicos, se hizo el montaje de las celdas de Franz con piel fresca y viva expuesta a ramnolípidos 5%, a SDS 10% y a NaCl 0.9%. Las dos últimas soluciones se emplearon como controles esperando una alteración celular mayor (control positivo) con la primera y mínimos cambios (control negativo) con la segunda. Este diseño se realizó en dos tiempos de exposición definidos (0.5 y 2 horas), esperando incremento en los cambios al aumentar el tiempo de exposición. Al líquido receptor en las celdas a las que se adicionó el biosurfactante, se le determinó la concentración de ramnolípidos en los tiempos de muestreo y con la metodología antes descrita.

Transcurridos los tiempos de exposición la piel se fijó mínimo por 24 horas, en formaldehído bufferado al 3.7%. Posteriormente se procesó para la inclusión en parafina y coloración de hematoxilina – eosina a través de técnicas de rutina (Luna, 1968), procesamiento realizado por PAW patología, quienes apoyaron el diagnóstico histológico.

Las principales lesiones observadas en el epitelio fueron edema intraepitelial, espongiosis y disminución de las capas de queratina; en tanto que en la dermis superficial se apreció edema. En cada uno de 10 campos microscópicos se hizo el conteo de estas alteraciones. Para las lesiones de la epidermis se contaron el número de células afectadas (edema intraepitelial y espongiosis) y el número de capas de queratina alteradas incluyendo su regularidad; el edema en dermis se describió según extensión y severidad. Se adjudicó un valor o graduación numérica a cada lesión según su cantidad y/o descripción, que osciló entre 0 (la lesión más leve) y 4 (la lesión más severa) (Tabla 3.2.).

3.4 Potencial de irritación ocular

3.4.1 HET-CAM

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por ICCVAM, 2010.

Obtencion de los huevos fértiles de gallina

Los huevos de gallina raza Rhode Island fueron obtenidos de la finca Santa María ubicada en Fusagasugá (Cundinamarca), colectados al día 2 de fertilización.

Incubación de los huevos

Cuarenta huevos se colocaron en una incubadora con bandeja giratoria (Ehret Labor-und Pharma) a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $60 \pm 2\%$, luego de 7 días de incubación con la ayuda de una lámpara de luz fría se comprobó la viabilidad del embrión y se ubicó y marcó la cámara de aire presente en el polo ancho del huevo.

Tabla 3.2. Puntaje asignado a las lesiones observadas en el epitelio

Región de piel	Reacción	Parámetro a evaluar en cada campo microscópico	Cantidad/ Descripción	Graduación numérica	
Epidermis	Edema intraepitelial	Número de células con la lesión	1-5	0	
			6-10	1	
			11-15	2	
			16-20	3	
			>20	4	
	Espongiosis	Número de células con la lesión	1-5	0	
			6-10	1	
			11-15	2	
		Queratina	Número de capas y regularidad de las mismas (R: regular; IR: Irregular). AQ: ausencia de queratina	16-20	3
				>20	4
				2-10 R	0
				2-10 IR	1
				2-5 IR	2
				0-2 IR	3
Dermis superficial	Edema	Extensión (F: focal; G: generalizado) y severidad (A: ausente; L: leve; M: moderado; S: severo)	AQ	4	
			AF	0	
			LF	1	
			MF	2	
			SF	3	
	G	4			

Desarrollo del ensayo

Empleando unas pinzas quirúrgicas se retiró cuidadosamente la cáscara que cubría la cámara de aire, golpeándola suavemente, posteriormente se humedeció la membrana interna con NaCl 0.9% y se retiró cuidadosamente sin lesionar las estructuras anexas, exponiendo así la membrana corioalantoidea (CAM).

Cada sustancia (control no irritante: NaCl 0.9%, control irritante moderado: SDS 1% y control irritante severo: NaOH 1N, ramnolípidos 5% y CAPB al 50, 25 y 5%) fue evaluada sobre tres

huevos, aplicando 300 μ L sobre la CAM y observando la aparición de lesiones (hemorragia - sangrado de los vasos, lisis - desintegración de los vasos y coagulación - desnaturalización proteica intra y extra-vascular) durante un periodo de 300 segundos, registrando el tiempo de aparición de cada una. Con este último dato se asignó un puntaje numérico a cada lesión, empleando la información de la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Esquema de puntaje para la prueba de irritación con HET-CAM (ICCVAM, 2010).

Efecto	Puntaje		
	0.5 min	2 min	5 min
Lisis vascular	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulación	9	7	5

Una prueba se considera aceptable si el control negativo y el positivo severo inducen cada uno una respuesta que cae dentro de la clasificación de no irritante y severamente irritante, respectivamente.

Los datos obtenidos de la ponderación de cada huevo fueron sumados y se promediaron los resultados de los tres huevos empleados por sustancia proporcionando un único indicativo del potencial de irritación. Con el puntaje obtenido, cada sustancia se clasifica según el esquema presentado en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Clasificación de puntajes acumulados (ICCVAM, 2010)

Puntaje acumulado	Clasificación
0 – 9.9	No irritante
10 – 14.9	Irritante ligero
15 – 18.9	Irritante moderado
19 - 21	Irritante fuerte

3.4.2 Lisis de glóbulos rojos

Las sustancias fueron evaluadas según la metodología descrita y validada por Pape et al., (1990) y validada por Leguizamón et al., 2011 en las instalaciones del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Recolección de sangre

Se colectó sangre de terneros sanos no medicados (no mayores a un año de edad) en viales de polietileno con buffer citrato como anticoagulante; posteriormente, por centrifugación a 1500 g por 10 minutos, se aislaron los glóbulos rojos (GR) que fueron lavados cuatro veces con PBS en proporción 2:5 y resuspendidos en PBS ajustando a un conteo final de 8×10^6 células/mL mediante cámara de Neubauer y suplementados finalmente con glucosa 10 mM. Esta suspensión se almacenó a 8 °C, máximo por 24 horas, antes de realizar las pruebas correspondientes.

Desarrollo del ensayo de hemólisis

En tubos de reacción de 2 mL, se incubó por 10 minutos, a temperatura ambiente y en constante agitación, la suspensión de GR con diferentes concentraciones del ramnolípidos (1, 10, 50, 100, 500, 1000 10000 y 100000 ppm) en proporción 1:1, desarrollando el mismo ensayo con el control positivo (SDS: 5, 10, 20, 40, 80, 100, 400, 600 y 1000 ppm). Para detener la incubación se centrifugó por un minuto a 112 g en microcentrífuga (Merck) y se monitoreó la concentración de HbO₂ en el sobrenadante a través de espectrofotometría con un $\lambda=577$ nm (Thermo-Scientific Evolution 60S), definiendo previamente el espectro de absorción molecular entre 500 y 650 nm. Se determinó la CH50 (concentración hemolítica media) ajustando la liberación de Hb al 100%, con la liberación ocasionada por cada concentración de la sustancia de prueba, expresada como porcentaje relativo de la liberación máxima de Hb con curva dosis respuesta mediante interpolación en la curva obtenida luego de un ajuste a un modelo no lineal de dosis respuesta de pendiente variable con un 95% de confianza en el paquete estadístico GraphPad Prism 8.

Desarrollo del ensayo de desnaturalización de proteínas

Se incubó el tensoactivo al 1% con los GR bajo las mismas condiciones empleadas en la hemólisis. Como patrón interno de desnaturalización total se tomó una concentración de SDS de 1000 ppm; el sobrenadante fue monitoreado a λ de 542 y 577 nm. Para el análisis de los resultados, la absorbancia a 577 nm se divide por la absorbancia a 542 nm, obteniendo la relación α/β , que se usa para calcular el índice de desnaturalización (ID) de Hb mediante la siguiente ecuación (EURL ECVAM, 2018a):

$$ID = \frac{R_1 - R_i}{R_1 - R_2} \times 100 \quad (3.1)$$

donde R_1 : relación α/β para HbO_2 sin emplear tensoactivo; R_2 : relación α/β para estándar interno (SDS 1000 ppm); $R_1 - R_2$: desnaturalización total de HbO_2 ; R_i : relación α/β para la sustancia evaluada; $R_1 - R_i$: desnaturalización debida al tensoactivo.

En el cálculo del índice de irritación se determinó con la relación CH_{50}/ID se emplea como medida del potencial de irritación ocular de acuerdo con la siguiente clasificación:

Tabla 3.5. Clasificación de la sustancia según el ensayo RBC (EURL ECVAM, 2018a)

Valor de la relación CH_{50}/ID	Clasificación
> 100	No irritante
> 10	Irritante ligero
> 1	Irritante moderado
> 0.1	Irritante
< 0.1	Muy irritante

3.5 Caracterización de riesgo

En este estudio se determinó la dosis de exposición sistémica de acuerdo a la ecuación 2.1 descrita en la sección 2.7. Los datos empleados para despejar la ecuación fueron obtenidos de la siguiente manera: 1) exposición diaria estimada según la información registrada en SCCS (2015); 2) concentración de sustancia en producto, corresponde al 5% según lo recomendado por el fabricante y 3) absorción cutánea determinada a través del ensayo de permeación *in vitro*, teniendo en cuenta los criterios básicos de la SCCS (2010) que considera a la dermis y a la epidermis (excepto estrato córneo) con capacidad de generar un efecto “sifón” por lo cual las cantidades allí encontradas se asumen como absorbidas y se suman a las cantidades halladas en el fluido receptor, pues contribuyen a la exposición sistémica.

La dosis de exposición sistémica (SED) fue calculada tomando en cuenta 3 escenarios: uso de la materia prima en la fabricación de champús, limpiadoras faciales y cremas faciales; además se comparó con el SED obtenido para SDS, tomando los datos teóricos de absorción dérmica reportados en por Moore (1983).

3.6 Análisis de resultados

Los estudios realizados permitieron aportar al perfil de seguridad de los ramnolípidos. Los datos de permeación dérmica fueron analizados a través de estadística descriptiva considerando el promedio y la desviación estándar de cada una de las tres réplicas referentes a la concentración del biosurfactante en las diferentes capas de la piel, tras 24 horas de exposición.

En los ensayos de citotoxicidad orientados a determinar la irritación dérmica, se hizo una comparación entre las diferentes sustancias en el mismo rango de concentración para cada línea celular; se empleó un test de Friedman para datos en bloques cuyo factor de control local fue la concentración. En los casos en los que se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), se realizó un análisis *post hoc* con el test de Conover empleando el paquete estadístico R Studio 3.4.2.

Como parte de la valoración de la irritación dérmica, se realizó la evaluación estadística a través de un diseño completo al azar, donde se analizó el promedio de la cantidad de las 5 lesiones

definidas en los 10 campos de observación de las pieles de cerdo expuestas a las tres sustancias (ramnolípidos, SDS 10% y NaCl 0.9%) en cada uno de los tiempos valorados (0.5 y 2 horas). Los supuestos de homogeneidad y normalidad se cumplieron con la prueba de Levene y Shapiro Wilk, respectivamente. Para determinar la presencia de diferencias estadísticas ($P < 0.05$) se aplicó un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples (Tukey) en todas las variables analizadas en los dos tiempos valorados. Todo esto a través del paquete estadístico Statistix 9.0. Por otra parte, la graduación numérica que fue adjudicada a cada lesión, en escala de 1 a 4, se sumó para cada sustancia y en cada tiempo de exposición para así determinar la severidad del daño observado (puntuación máxima 16).

Los datos de HET-CAM y RBC fueron analizados de acuerdo al contexto del protocolo seguido, en el que a través de una metodología correctamente aplicada, se obtienen puntajes de irritación que clasifican a la sustancia dentro de una categoría de irritación ocular.

Finalmente, con los datos obtenidos en el ensayo de permeación cutánea, fue posible tener una caracterización parcial del riesgo toxicológico al calcular el SED.

4. Resultados y discusión de resultados

En nuestro medio, la evaluación de seguridad para PC y PCP es un tema relativamente nuevo que se deriva de la creciente oferta y demanda de este tipo de productos en el mercado, así como de la restringida cantidad de ingredientes que pueden ser usados en su formulación dadas las limitantes que la definición de “producto cosmético” impone (Nohynek et al., 2010). Al contrario, en otros países principalmente europeos el ámbito toxicológico asociado a los productos de uso cotidiano se ha abordado de manera muy consiente desde hace varios años, tanto así que existen restricciones para la comercialización si no se cuenta con información toxicológica robusta (Hartung, 2008).

Una condición adicional para el testeo de cosméticos es la prohibición de la experimentación en animales que año tras año toma más fuerza en muchos países. En este sentido Colombia aprobó el proyecto de ley contra la experimentación en animales para la industria cosmética en el año 2018, lo cual dispone una fuerte presión encaminada a la búsqueda y desarrollo de métodos rápidos, eficaces y confiables que permitan evaluar la seguridad de los nuevos productos y materias primas (Ley 120C, 2018).

Los ramnolípidos hacen parte de un grupo de nuevas moléculas de origen biotecnológico que buscan ampliar la oferta de materias primas para formulación de PC y PCP, cuyo valor agregado se soporta en sus características estructurales de similitud a sustancias endógenas de la piel humana (Vecino et al., 2017). Es útil por lo tanto reconocer la seguridad de estos nuevos ingredientes de los que se espera tengan menores efectos negativos sobre la salud.

4.1 Permeación dérmica

En el líquido receptor no se cuantificaron los ramnolípidos (LOQ = 0.104 ppm) en ninguno de los tiempos valorados. La Tabla 4.1. indica la cantidad y el porcentaje de biosurfactante que permeó las diferentes capas de la piel.

Tabla 4.1: Cantidad de ramnolípidos permeada a epidermis y dermis luego de 24 horas de exposición.

Estrato	Profundidad (μm)	Cantidad permeada* (μg)	Porcentaje de la cantidad total dispensada **
	6.5	1267.2 \pm 417.3	50.7 \pm 16.7
Estrato córneo	13	590.1 \pm 94.6	23.6 \pm 3.8
	19.5	425.4 \pm 358.3	17.1 \pm 14.3
	26	71.62 \pm 61.2	2.86 \pm 2.5
Epidermis viva	72	5.97 \pm 4.32	0.24 \pm 0.17
Dermis		ND	ND
Total			94.4 \pm 7.5

* Cantidad total de sustancia hallada en cada nivel de profundidad.

** Porcentaje con respecto a 12.5 μg

ND: no detectable

Se observan altas desviaciones estándar en la concentración de ramnolípidos en las diferentes profundidades de la piel, seguramente debido a la variabilidad biológica propia de las pieles provenientes de los diferentes donantes cuyas características particulares influyen sobre el espesor de los cortes, situación similar ocurre con las capas de estrato córneo retiradas por el método de tape stripping.

Se aprecia que el 94.4% de la cantidad de ramnolípidos depositados, logra penetrar el estrato córneo y distribuirse en diferentes capas de la piel, de este porcentaje el 92% queda depositado en la capa de corneocitos y el 50.7% se encuentra retenido en las capas celulares más

superficiales (6.5 μm); además se logra determinar que el 0.24% logra permear hasta la epidermis viva. El estrato córneo presenta características principalmente lipófilas y por lo tanto se considera que las moléculas quedan allí retenidas perdiéndose con la descamación de los corneocitos, de tal manera que no tienen capacidad de ser absorbidas (SCCS, 2010). Se muestra además cómo se distribuyeron los ramnolípidos a diferentes profundidades de la epidermis indicando que a mayor profundidad se halló menor presencia del biosurfactante. En la dermis no se detectó presencia de ramnolípidos con el método espectrofotométrico empleado.

El principal componente de la muestra evaluada es un di-ramnolípidos ($\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$) con peso molecular de 650.8 g/mol (650.8 Da), el cual, como describen algunos autores (OECD, 2012) es de un tamaño demasiado grande para penetrar el estrato córneo, sin embargo, dada su similitud estructural con los lípidos y ceramidas de la piel (contiene ácido decanoico en su estructura) y su comportamiento a $\text{pH} < 5.4$ (hidrofóbico), esta molécula no tiene facilidad para desplazarse a través del manto hidrolipídico. Esto es compatible con los hallazgos registrados en la Tabla y Figura 4.1 donde se indica la cantidad y porcentaje de ramnolípidos que permearon a las diferentes capas de la piel.

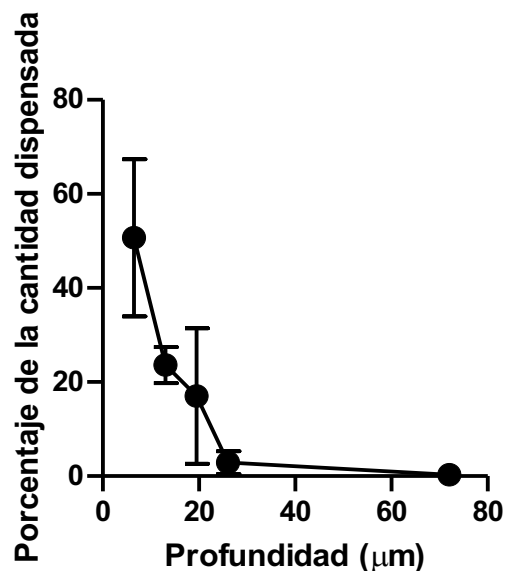


Figura 4.1: Concentración de ramnolípidos (expresados en % de la cantidad total dispensada) según profundidad de la epidermis luego de 24 horas de exposición.

La molécula en la concentración a la que fue empleada (5%), que es la sugerida por el fabricante para la elaboración de formulaciones cosméticas y bajo las demás condiciones del ensayo, no es capaz de penetrar más allá de la epidermis, quedando retenida en las estructuras que componen esta capa. De la misma manera tampoco fueron hallados niveles de ramnolípidos en los lavados de piel al finalizar la exposición (24 horas).

Según las notas de la SCCS (2010), las cantidades medidas en dermis, epidermis (sin estrato córneo,) y el fluido receptor se deben considerar como absorbidas, por lo tanto, se puede afirmar que el 0.24% de la dilución de ramnolípidos a una concentración del 5% tiene la capacidad de pasar a la circulación sistémica luego de un periodo de exposición de 24 horas a través de la piel. Este valor fue empleado para realizar la caracterización del riesgo.

En los muestreos de líquido receptor realizados sobre piel fresca y viva tampoco se detectó la presencia de la sustancia de prueba, esta observación confirma que al momento de la piel ejercer su función de barrera, la integridad del tejido (comprobado a través de la medición de TER) es más relevante que su viabilidad celular. De esta manera es indistinto hacer ensayos de permeación con piel muerta (congelada) o viva (procedente de animal recientemente sacrificado y transportada en medios apropiados) tal como lo indica el documento guía de la OECD (2004b). En todo caso los ensayos desarrollados con piel viable, representan utilidad si el interés es valorar la capacidad metabólica de la piel (OECD, 2004b) o como en nuestro caso, se pretende analizar los efectos de las sustancias sobre la morfología celular (ver más adelante).

El empleo de la cafeína como control positivo de absorción es típico ya que esta molécula logra penetrar hasta capas profundas de la piel (hipodermis), este control permite verificar el desempeño del ensayo y las condiciones de las pieles empleadas. La Figura 4.2 muestra la cantidad de cafeína acumulada hallada en el líquido receptor en los diferentes tiempos de muestreo, donde a las 24 horas de exposición se logra la cuantificación del 98% de la cafeína dispensada inicialmente sobre la superficie de la piel.

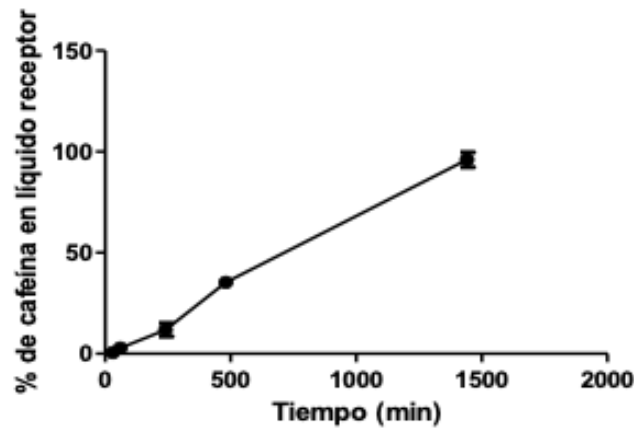


Figura 4.2: Cantidad de cafeína que absorbida cuantificada en el líquido receptor expresada como porcentaje de la cantidad total dispensada

Dado el perfil de permeación y acumulación de los ramnolípidos en la epidermis se puede establecer un alto potencial de uso en la formulación de productos cosméticos, pues no es absorbido a capas profundas de la piel como la dermis e hipodermis por lo cual disminuye el riesgo de exposición sistémica por vía dérmica. De igual manera este perfil de distribución en las capas de piel puede ser de gran utilidad sobre la proliferación de células epidermales como potenciador de la cicatrización, ya que una pequeña parte de la concentración administrada logra llegar hasta la epidermis máxime si se tiene en cuenta en cuenta que esta concentración puede aumentar sobre una piel lastimada o con estrato córneo disminuido (Stipcevic y cols, 2005, 2006). Sin embargo, se debe aclarar que la disponibilidad de la molécula variará según el tipo de formulación en la que sea empleada, donde podrá encontrarse con otras materias primas que modifiquen su disponibilidad, por ello cada caso debe evaluarse de manera independiente.

4.2 Potencial de irritación dérmica

Para reconocer el potencial daño que los ramnolípidos pueden ejercer sobre células de la piel y como método de screening de irritación dérmica, se valoró la citotoxicidad sobre línea celular de queratinocitos humanos (HaCat) y de fibroblastos murinos (3T3 Balb/c) comparando con otros surfactantes de uso común en cosméticos. El análisis estadístico empleando el test de Friedman evidencia que existen diferencias significativas entre las sustancias a la misma

concentración para ambas líneas celulares ($P = 0.002$). Por ello, se realizan las comparaciones entre las sustancias con el test de Conover y se obtienen las significancias descritas en la Tabla 4.2, en la que se observa que los ramnolípidos tienen un comportamiento similar al polisorbato 20 sobre los fibroblastos y que sobre los queratinocitos este biosurfactante se comporta diferente a los demás tensoactivos valorados. Dado que la mezcla de ramnolípidos se retuvo en epidermis, es más relevante considerar los resultados sobre la línea de queratinocitos 3T3 Balb/C.

Tabla 4.2: Comparación de la citotoxicidad de las diferentes sustancias para cada línea celular

Línea celular	Surfactante	Surfactante		
		CAPB	Polisorbato 20	Ramnolípidos
3T3 Balb/C	Polisorbato 20	0.006*	-	-
	Ramnolípidos	0.022*	0.534	-
	SDS	0.000*	0.000*	0.000*
HaCat	Polisorbato 20	0.004*	-	-
	Ramnolípidos	0.000*	0.030*	-
	SDS	0.064	0.000*	0.000*

*Diferencia estadísticamente significativa, $\alpha = 0.05$

La Figura 4.3 señala el porcentaje de supervivencia de las células expuestas a diferentes concentraciones de los surfactantes evaluados.

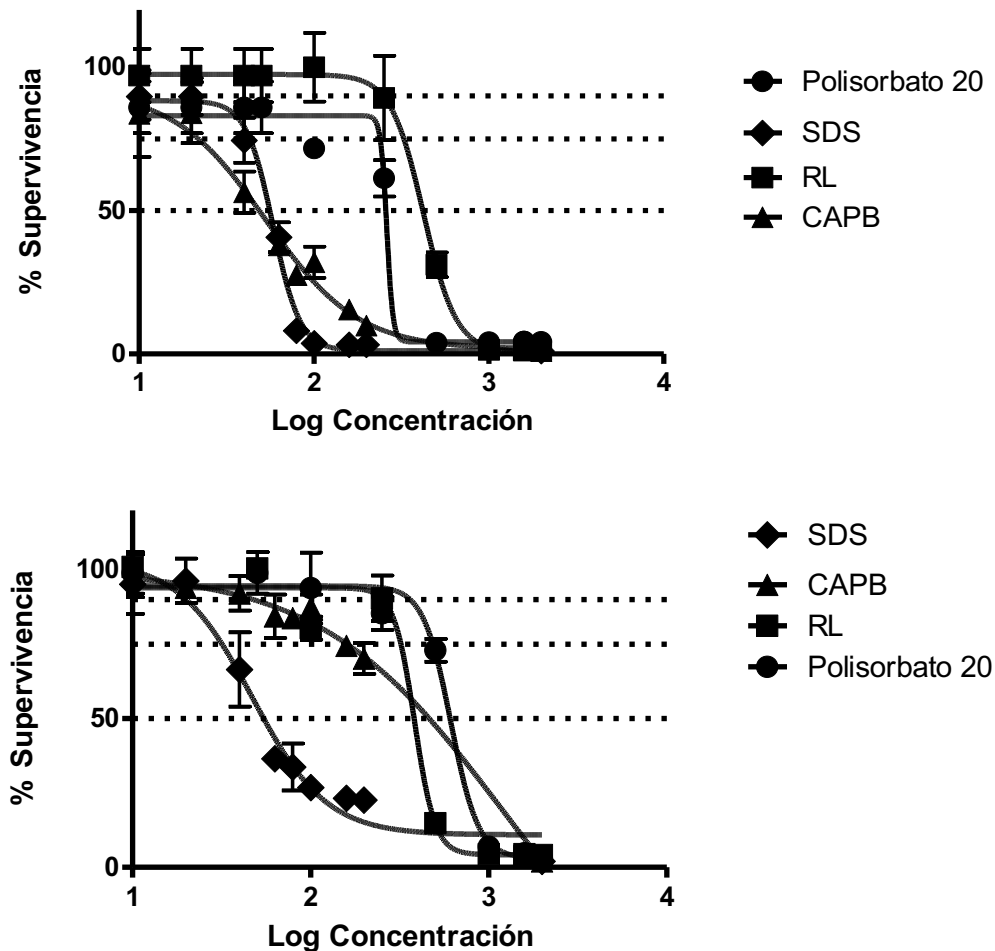


Figura 4.3: Porcentaje de supervivencia celular de líneas HaCat (arriba) y 3T3 Balb/c (abajo) expuestas a diferentes concentraciones de surfactantes. RL: ramnolípidos; CAPB: cocamidopropilbetaína, SDS: dodecil sulfato de sodio.

Se observa que para HaCat a concentraciones entre 50 y 500 ppm (Log Conc 1.7 y 2.4), la mezcla de ramnolípidos tiene un menor potencial citotóxico sobre el sistema celular en comparación con los otros surfactantes empleados. Sin embargo, a concentraciones mayores la curva aumenta considerablemente su pendiente, lo cual es evidencia del aumento de la potencia tóxica sobre las células, revelando que con pequeños cambios de concentración aumenta la magnitud del daño sobre el sistema celular, por lo cual podría aumentar el riesgo de irritación.

Sobre fibroblastos (3T3 Balb/c) se observa que hasta una concentración aproximada de 500 ppm los ramnolípidos tienen un comportamiento comparable al de los polisorbatos (surfactantes no iónicos), sin embargo, a concentraciones superiores posee mayor potencial citotóxico.

El comportamiento observado sobre ambas líneas celulares en términos de la potencia, visualizado por la empinada pendiente de la curva, es esperable según las características moleculares de los ramnolípidos (aniónicos) ya que pueden mostrar mayor toxicidad dadas las cargas que aportan sobre la membrana celular de naturaleza catiónica, permitiendo una buena adhesión de las moléculas del surfactante y facilitando la interacción con los lípidos de membrana (Effendy y Maibach, 1995). A pesar de ello y gracias al parecido estructural con los componentes de la membrana celular, a diferencia de la cocamidopropil betaína de naturaleza anfótera, no se muestra tan agresivo contra el sistema celular como el SDS de naturaleza aniónica que se clasifica como irritante medio (EURL ECVAM, 2018d).

La Tabla 4.3 indica la CI_{50} obtenida para cada surfactante evaluado. Como se estima en la Tabla 4.3 que indica la CI_{50} calculada a partir de la curva de citotoxicidad, el surfactante menos tóxico para HaCat fue la mezcla de ramnolípidos que tuvo menor toxicidad celular, incluso aproximadamente 8 veces menor que SDS y CAPB. Para el caso de 3T3 Balb/c, son los ramnolípidos y el polisorbato 20 los menos tóxicos. Comparativamente, los ramnolípidos son 17 veces menos tóxicos que el SDS (surfactante de frecuente uso en la industria cosmética).

Tabla 4.3: Valores de CI_{50} de diferentes tensoactivos sobre HaCat y 3T3 Balb/c

Surfactante	HaCat	3T3 Balb/c
	CI_{50} (ppm)	CI_{50} (ppm)
Ramnolípidos	417.8 ± 1.2	457.1 ± 1.1
Dodecil sulfato de sodio	51.8 ± 1.1	26.4 ± 1.2
Polisorbato 20	261.8 ± 0.9	609.5 ± 1.3
Cocamidopropil betaína	48.7 ± 1.4	411.1 ± 1.5

Toda la información derivada, determina que los ramnolípidos tienen un comportamiento citotóxico similar al de surfactantes no iónicos (como el polisorbato) y diferente a los aniónicos convencionales (SDS) confirmando cualidades favorables de seguridad. Sobre queratinocitos se evidencia diferencia de los ramnolípidos con respecto todos los surfactantes empleados en

la comparación, sin embargo, el comportamiento de dichos ramnolípidos es intermedio entre el polisorbato 20 y el CAPB.

El análisis de los cambios producidos sobre las células resulta de interés y utilidad pues como sostienen algunos autores la acción citotóxica y la liberación de varias enzimas y mediadores son las características de la irritación cutánea más fácilmente evaluadas en las pruebas *in vitro* (Effendy y Maibach, 1995). El punto final evaluado en estos estudios consiste en determinar la viabilidad celular a través de la reducción mitocondrial del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a un producto de formazán coloreado (violeta) que se acumula al interior celular debido a su inhabilidad para pasar la membrana celular (EURL ECVAM, 2018c). La habilidad de las células para reducir MTT provee una indicación de la integridad mitocondrial que puede ser interpretada como viabilidad. En todo caso, los estudios sobre líneas celulares se consideran métodos de screening para valorar irritación dérmica. Existen en la actualidad métodos oficiales que consisten en cultivos tridimensionales de queratinocitos muy parecidos a los de la epidermis real que son los ideales al considerar la evaluación *in vitro* de la irritación dérmica (Vinardell y Mitjans, 2008). Dado su complicado acceso en nuestro medio, determinado en costos y tiempos de importación de los kits comerciales, considerar la valoración histológica de piel empleada en estudios de permeación, podría constituir una alternativa. En este sentido se analizó la piel de cerdo viva expuesta en celdas de Franz, comparando los efectos con soluciones patrón y en dos tiempos de exposición.

La Tabla 4.4 señala la cuantificación (promedio en 10 campos de observación) de las cinco principales alteraciones en las pieles de cerdo expuestas a NaCl 0.9% (control negativo), SDS 10% (control positivo) y ramnolípidos 5%; la Figura 4.4 ilustra estos hallazgos. Para la cuantificación de las lesiones se hizo una comparación a través de un test de Tukey cuyos resultados se muestran en esta misma Tabla.

Se observa que el SDS al 10% produce mayor cantidad de lesiones en comparación con las otras dos sustancias, en general los ramnolípidos tienen un comportamiento estadísticamente similar al del control negativo; la cantidad de lesiones aumenta con el tiempo de exposición, sin embargo, los ramnolípidos se muestran con mejor comportamiento pues en la mayoría de las lesiones se agrupan con el control negativo (excepto en edema intraepitelial a 2 horas de exposición).

Tabla 4.4: Cambios histológicos tras la exposición de la piel viable a ramnolípidos, SDS y NaCl.

Tiempo	Lesión	Sustancia	Cantidad de lesiones observadas*
0.5 h	Edema dérmico	RL 5%	1.0 ± 0.7 ^{AB}
		NaCl 0.9%	0.6 ± 0.5 ^B
		SDS 10%	1.2 ± 0.4 ^A
	Edema intraepitelial	RL 5%	6.2 ± 1.4 ^B
		NaCl 0.9%	2.8 ± 0.8 ^B
		SDS 10%	6.2 ± 1.9 ^A
	Espangiosis	RL 5%	0.6 ± 0.5 ^B
		NaCl 0.9%	0.7 ± 0.5 ^B
		SDS 10%	1.8 ± 0.4 ^A
	Queratina	RL 5%	0.8 ± 0.6 ^{AB}
		NaCl 0.9%	0.7 ± 0.5 ^B
		SDS 10%	1.4 ± 0.8 ^A
2 h	Edema dérmico	RL 5%	0.6 ± 0.5 ^B
		NaCl 0.9%	0.7 ± 0.5 ^B
		SDS 10%	1.6 ± 0.7 ^A
	Edema intraepitelial	RL 5%	5.3 ± 1.6 ^A
		NaCl 0.9%	2.8 ± 1.4 ^B
		SDS 10%	8.6 ± 3.9 ^A
	Espangiosis	RL 5%	0.8 ± 0.4 ^B
		NaCl 0.9%	0.7 ± 0.5 ^B
		SDS 10%	1.6 ± 0.7 ^A
	Queratina	RL 5%	0.3 ± 0.5 ^B
		NaCl 0.9%	1.0 ± 0.7 ^B
		SDS 10%	1.6 ± 0.7 ^A

* Cada valor corresponde al promedio de la cantidad de lesiones en 10 campos de observación. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), para la misma sustancia en cada tiempo de exposición.

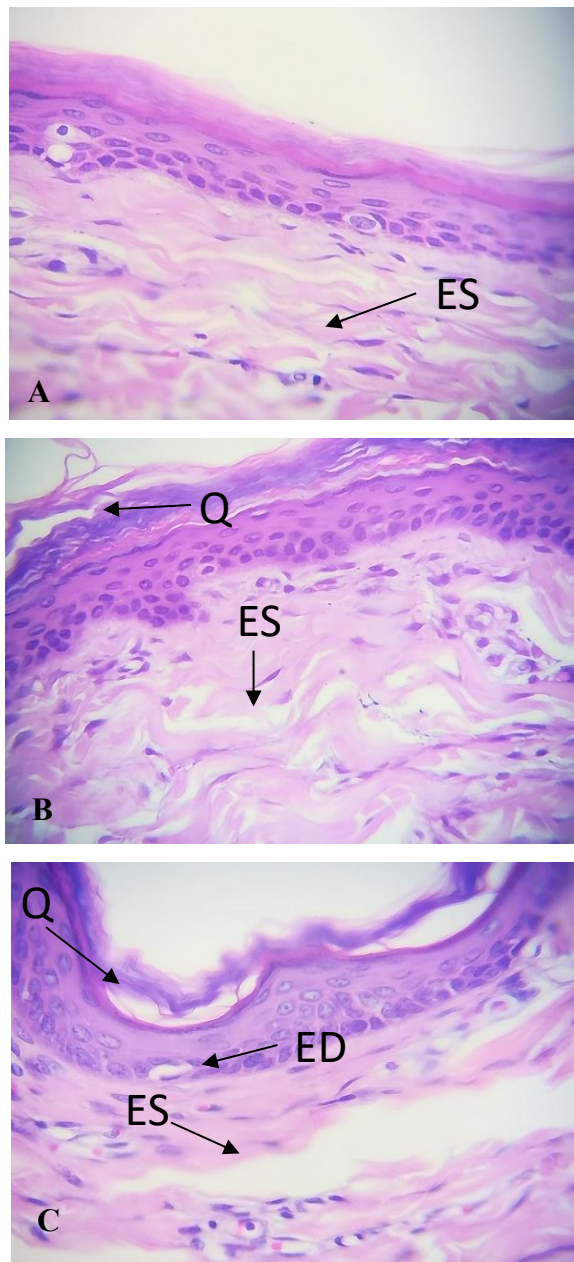


Figura 4.4: Cambios microscópicos en la piel viable luego de la exposición a las sustancias. A: control negativo, B: SDS 10%, C: Ranolípido 5%. Q: Queratina irregular, ES: Espongiosis, ED: edema en dermis superficial.

La Tabla 4.5 indica la severidad de las lesiones observadas dada la puntuación asignada al promedio de las mismas y señala la sumatoria total de estos valores.

Tabla 4.5: Graduación numérica de las lesiones observadas

Lesión	SDS 10%		NaCl 0.9%		Ramnolípidos 5%	
	0.5 horas	2 horas	0.5 horas	2 horas	0.5 horas	2 horas
Edema intraepitelial	1	1	0	0	0	1
Espongiosis	1	2	1	1	1	2
Queratina	1	2	1	1	0	1
Edema en dermis	1	2	1	1	1	1
Total	4	7	3	3	2	5

Se puede apreciar que al graduar la lesiones, la piel expuesta a ramnolípidos por 0.5 horas presenta diferencias importantes con respecto a la piel expuesta a SDS 10% (control positivo), apreciándose que los efectos del primero son aproximadamente dos veces más leves. En la epidermis de la piel expuesta a SDS 10% hay una mayor separación de los estratos basal y espinoso (capa de Malpigio) que conduce a una acumulación de líquidos, lesión conocida como espongiosis. Igualmente hay menor número de capas de queratina en el estrato córneo disponiéndose de manera irregular. Otro cambio relevante es la presencia de abundante edema en la dermis de la piel expuesta a SDS 10% por un periodo de 2 horas. Las lesiones son dependientes del tiempo de exposición para los dos surfactantes valorados y se aprecia que los cambios generados por NaCl 0.9% son mínimos en comparación con los tensoactivos. Se menciona que los surfactantes pueden desnaturalizar la queratina, causar inflamación epidermal y solubilizar componentes higroscópicos del estrato córneo como resultado de la pérdida de flexibilidad, resequedad, rugosidad e incremento de la descamación de la superficie epitelial, (Jian et al, 2014; Perinelli et al., 2017). Adicionalmente, se observa que al aumentar el tiempo de exposición la gravedad de las lesiones se intensifica de manera que a las 2 horas de exposición las lesiones causadas por los ramnolípidos tienen tendencia a parecerse a las del SDS. Por tratarse de piel aislada no pueden apreciarse los mismos cambios que se describen en procesos irritativos, particularmente la inflamación; sin embargo, se aprecia pérdida de queratina y edema que indica la posibilidad de un descenso concomitante de la función barrera.

A la fecha existe únicamente un protocolo *in vitro* aceptado y aprobado por organismos internacionales con competencia toxicológica como la OECD como alternativa de reemplazo para evaluar la irritación dérmica, este ensayo es desarrollado sobre un modelo de tejidos reconstruidos 3D que evalúa la viabilidad celular luego de la exposición a las sustancias en las diferentes capas del tejido, sin embargo, este tipo de insumos son de difícil acceso en nuestro país y en la región ya que implica importantes complicaciones a nivel logístico (corta viabilidad y largos tiempos de importación) y económico (un kit de 24 tejidos, tiene un costo de alrededor \$ 10'000.000 COP, con tendencias a aumentar su costo debido a la desvalorización de nuestras monedas frente al dólar), por lo cual, se hace necesario desarrollar modelos con alto valor predictivo y de fácil acceso.

El método acá planteado se muestra como una solución promisorio a las necesidades de la industria cosmética nacional en crecimiento, es importante resaltar que en estudios posteriores la caracterización de las lesiones histológicas puede ser hecha para piel expuesta a diferentes sustancias químicas con categorías de irritación variadas y reconocidas para así postular, empleando esta metodología, la clasificación de las sustancias según su potencial irritante dérmico.

4.3 Potencial de irritación ocular

La Tabla 4.6 contiene los resultados obtenidos a través de la prueba de HET-CAM donde fueron evaluados ramnolípidos (100, 50 y 1%) y CAPB (50, 25 y 5%) y SDS al 1%. Se aprecia que en la concentración del 100% los ramnolípidos presentan una leve irritación y no se observan diferencias respecto al surfactante CAPB altamente empleado en la formulación de productos de cuidado personal y para el hogar, no obstante, se logró observar que las hemorragias producidas por los ramnolípidos a concentraciones intermedias (50 y 10%) eran menos intensas comparadas con las producidas por CAPB, lo cual es evidencia de un comportamiento diferencial en términos de menor potencial de irritación ocular. Estos resultados muestran correlación con lo reportado por Mehling et al., (2007) que clasifican al SDS y CAPB como irritantes moderados.

Tabla 4.6: Resultados HET-CAM aplicado a la evaluación de la irritación ocular de diferentes surfactantes

Producto	Concentración	Puntaje Lisis	Puntaje Hemorragia	Puntaje Coagulación	Puntaje Total	Clasificación
RL	100%	5	5	5	15	Irritante moderado
	50%	5	3	5	13	Irritante leve
	10%	5	3	5	13	Irritante leve
CAPB	50%	5	5.7	5	15.7	Irritante moderado
	25%	5	5	5	15	Irritante moderado
	5%	5	3	5	13	Irritante leve
NaOH	0.1N	5	7	9	21	Irritante severo
SDS	1%	5	5	5	15	Irritante moderado
NaCl	0.9%	1	3	5	9	No irritante

Las Tablas 4.7 y 4.8 muestran los resultados obtenidos en el ensayo RBC donde se aprecia que la relación lisis/desnaturalización para los ramnolípidos permite su clasificación como una sustancia no irritante, corroborando la mayor toxicidad del SDS, que tiene una CH50 aproximadamente 200 veces mayor los ramnolípidos. El principio de este ensayo consiste en evaluar el daño sobre la membrana causado, mediante la desnaturalización de hemoglobina y la cantidad de hemoglobina filtrada al sobrenadante (Mehling et al., 2007).

Existe una clara relación dosis-respuesta para las moléculas evaluadas, de modo que a medida que se diluye la concentración de ramnolípidos existe una mejora en el perfil de irritación, disminuyendo el riesgo. Estas diferencias en comportamiento se confirman a través del ensayo RBC donde se clasifica la sustancia de prueba como un no irritante, mientras que otros surfactantes como el SDS y el CAPB son clasificados como irritante y moderadamente irritante correspondientemente (ECVAM 2018a) dada su relación lisis/desnaturalización (CH50/ID). Se

observa en la curva obtenida para el porcentaje de lisis que a concentraciones entre 10 y 10000ppm el porcentaje de glóbulos dañados es inferior al 50% (50% de supervivencia celular) que puede ser interpretado como un umbral de seguridad para observar efectos como irritante ocular. Este último análisis confirma los resultados obtenidos en el ensayo sobre CAM a concentraciones de 10 y 50%.

Las reacciones de los tensoactivos a nivel ocular incluyen desde enrojecimiento y lagrimeo hasta daños severos al tejido ocular, ello dependiendo de la concentración, la naturaleza química y el pH (Mehling et al., 2007) este último factor es el de menos impacto en los PCP ya que estas formulaciones tienen pHs compatibles con los fisiológicos. Se observa adicionalmente una buena correlación y complementariedad entre los ensayos desarrollados, ya que el RBC permite evaluar los cambios celulares que actúan como primeros pasos de un proceso irritativo con la sensibilidad suficiente para simular las características del tejido conjuntival, y el HET-CAM permite evaluar cambios macroscópicos en el tejido como evidencia de una lesión extendida a nivel celular y reacciones complejas como la inflamación (Yan et al., 2007).

El ensayo HET-CAM ha mostrado tener buena correlación con las observaciones in vivo en humanos principalmente en lesiones sobre la conjuntiva bulbar, la conjuntiva palpebral y los vasos esclerales (Yan et al., 2007).

Tabla 4.7: Porcentaje de lisis de glóbulos rojos a 577nm

Sustancia	Concentración (ppm)	% lisis	CH ₅₀ (ppm)
Dodecil sulfato de sodio	5	0.2 ± 0.0	178.4 ± 30.9
	10	0.5 ± 0.0	
	20	0.7 ± 0.0	
	40	0.8 ± 0.1	
	80	0.9 ± 0.0	
	100	40.8 ± 0.2	
	400	81.2 ± 9.7	
	600	69.7 ± 6.6	
	1000	100.0 ± 0.0	
	Ramnolípidos	1	
10		0.6 ± 0.2	
50		0.4 ± 0.1	
100		0.5 ± 0.1	
500		1.0 ± 0.0	
1000		13.1 ± 1.7	
10000		49.1 ± 9.5	
10000	75.6 ± 6.0		

Tabla 4.8: Relación α/β y cálculo del índice de desnaturalización de Hb

Sustancia	R ₁	R ₂	R _i	ID	CH ₅₀ /ID	Clasificación
Blanco	1.5	-	-			
SDS 1000 ppm	-	23.565	-	40.3	863.7	No irritante
RL 1%	-	-	10.388			

R₁: relación α/β para HbO₂ sin emplear tensoactivo; R₂: relación α/β para estándar interno; R_i: relación α/β para la sustancia evaluada; CH₅₀: concentración hemolítica 50 e ID: índice de desnaturalización.

4.4 Caracterización del riesgo

La Tabla 4.9 indica los datos necesarios para caracterizar el riesgo del uso de ramnolípidos y SDS dentro de algunas formulaciones de uso cosmético, tal como se indica en el apartado 6.5 empleando la ecuación 1, mediante el cálculo de SED.

Tabla 4.9: Caracterización del riesgo de la mezcla acuosa de ramnolípidos en diferentes productos cosméticos

Producto	Exposición diaria (mg/kg)*	SED*(µg/kg) ramnolípidos
Champú	1.51	0.18
Limpiadora facial	8.33	0.99
Crema facial	24.14	2.9

*Dato tomado de SCCS, 2015

Nota: Los valores de absorción dérmica para ramnolípidos fueron calculados a partir del ensayo de permeación siguiendo las recomendaciones de la SCCS, 2015 donde se tienen en cuenta las cantidades retenidas en epidermis viva (estratos basal, espinoso y granuloso).

El dato teórico de permeación para el SDS a 24 horas de exposición (solución acuosa al 7%) indica que el 70% de la sustancia se encuentra en las capas de la piel (Moore, 1985) los valores de exposición sistémica para cada uno de los escenarios contemplados serían mayores para esta sustancia (hasta 3 órdenes de magnitud), sin embargo, estos datos no generan plena confiabilidad debido a que fueron obtenidos mediante métodos *in vivo* con dosis no mayores al 10% preferentemente sobre piel de ratón que como se ha mencionado presenta importantes diferencias con las características de la piel humana (Monteiro-Riviere et al., 2008).

El riesgo de exposición sistémica y los posibles efectos que esta pudiera desencadenar se ve mitigado al emplear ramnolípidos y los productos que contengan esta materia prima se pueden considerar más seguros. Estas observaciones sumadas al hecho que productos como una crema facial tienen un factor de retención (SCCS, 2015) más alto ya que son no enjuagables y pueden llegar a usarse más de una vez al día.

La combinación de ensayos empleada como aproximación a los efectos tóxicos que podría causar la exposición dérmica a la mezcla de ramnolípidos permite visualizar de manera más completa el comportamiento de estas moléculas. Eskes et al. (2005) mencionó que no es probable que un solo sistema de prueba *in vitro* pueda reemplazar el rango de lesiones detectadas con la prueba de Draize, y se reconoce además que las baterías de prueba que combinan una prueba de citotoxicidad con una organotóxica parecen proporcionar un medio eficaz para identificar productos químicos irritantes

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El perfil de permeación indica que los ramnolípidos quedan retenidos preferentemente en estrato corneo lo cual es un comportamiento deseable para un producto cosmético, además su uso implica una baja posibilidad de exposición sistémica, lo cual mejora sus descriptores de riesgo. Este mismo comportamiento hace pensar en la factibilidad de uso de los ramnolípidos en la formulación de productos cosmeceúticos con propiedades de cicatrización.

Los ensayos de screening para irritación dérmica sugieren un menor potencial de irritación en comparación con otros surfactantes de uso común en esta industria, además los resultados obtenidos a partir de la evaluación histológica proporcionan una herramienta valiosa que mejora la comprensión de los procesos irritativos que se pueden producir *in vivo*, como herramienta adicional frente a los métodos aprobados internacionalmente, pero de difícil acceso en nuestro medio.

La citotoxicidad sobre líneas celulares características del tejido de interés (queratinocitos y fibroblastos para nuestro caso) resulta un candidato útil como aproximación a la toxicidad que puede ser causada por el contacto dérmico de algunas sustancias, especialmente aquellas con perfiles de irritación medios y moderados, que no son fácil y adecuadamente identificados por la mayoría de los métodos alternativos disponibles. Por su parte, ensayos como HET-CAM y RBC además de ser prácticos y de fácil acceso actúan como una buena fuente de información de seguridad a nivel ocular, gracias a su correlación con SGA (RBC).

Dadas las observaciones obtenidas, se puede afirmar que la mezcla acuosa de ramnolípidos analizada podría resultar segura para ser empleada en productos cosméticos donde el mayor riesgo consiste en el contacto ocular y dérmico (limpiadoras faciales, shampoos, etc.), la

exposición durante largos periodos de tiempo es de poca incidencia y las concentraciones para la formulación de este tipo de productos son bajas (inferiores a 5%). Sin embargo, es importante considerar que la formulación definitiva en la que se incluye esta materia prima, modificará su permeación e interacción con el estrato corneo ya que puede variar el coeficiente de partición, generar interacciones entre ingredientes e incluso la decisión de la concentración final de los ramnolípidos en el producto puede influir, pues en muchos casos la absorción desde formulaciones menos concentradas aumenta (SCCS, 2015),

5.2 Recomendaciones

Se debe explorar más profundamente la posibilidad de emplear la evaluación histológica como herramienta adicional en pieles expuestas a través de celdas de Franz y así identificar procesos irritativos a nivel dérmico, en especial para aquellas sustancias y/o mezclas con clasificaciones intermedias, de manera que se pueda constituir como una opción frente a los métodos internacionalmente validados y aprobados pero de difícil acceso en nuestro medio. Esto a través del empleo de una matriz de sustancias más amplia para verificar su poder predictivo.

Es importante realizar estudios de seguridad para productos cosméticos no solo por el alto nivel de uso de estos, sino también como compromiso de calidad y promesa de valor frente al consumidor para una industria que es cada día más grande y competitiva en nuestro país.

A. Anexo 1: Curva de calibración para la cuantificación espectrofotométrica de ramnolípidos

Tabla 1. Curva de calibración para determinación de ramnolípidos en una matriz acuosa

Concentración de RL (ppm)	Absorbancia (UA)			Promedio
	R1	R2	R3	
1000	1,040	1.080	1.003	1.041 ± 0.04
600	0.855	0.984	0.925	0.921 ± 0.06
300	0.668	0.609	0.623	0.633 ± 0.03
150	0.553	0.569	0.579	0.567 ± 0.01
75	0.454	0.432	0.468	0.452 ± 0.02
37.5	0.359	0.386	0.359	0.368 ± 0.02

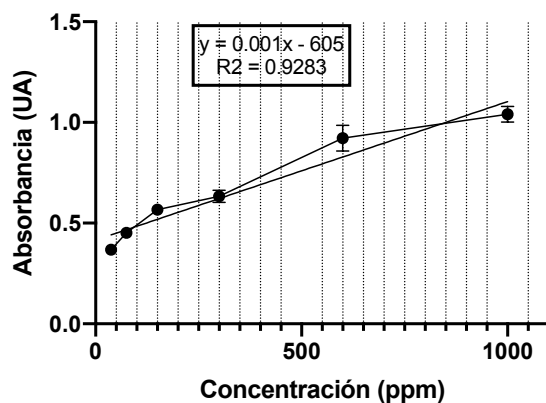


Figura 1. Curva de calibración para la determinación de ramnolípidos en una matriz acuosa

Bibliografía

Ackermann, K., Borgia, S. L., Korting, H. C., Mewes, K. R., y Schäfer-Korting, M. (2010). The Phenion® full-thickness skin model for percutaneous absorption testing. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(2), 105-112.

Andersen, M. E., y Keller, W. C. (1984). Toxicokinetic principles in relation to percutaneous absorption and cutaneous toxicity (No. AFAMRL-TR-83-093). Air force aerospace medical research lab wright-patterson. En Dren and Lazar. Cutaneous Toxicity, (pp. 9-21). New York, USA, Raven Press.

ATCC. (2018). NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) [fotografía]. Recuperado de: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1658.aspx> . Consultado: 6/7/2019.

Bartosova, L., y Bajgar, J. (2012). Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Current Medicinal Chemistry*, 19(27), 4671-4677.

Becerril Bravo, J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Tema del mes*.

Belay, A., Ture, K., Redi, M., y Asfaw, A. (2008). Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. *Food Chemistry*, 108(1), 310-315.

Benincasa, M., Marqués, A., Pinazo, A., y Manresa, A. (2010). Rhamnolipid surfactants: alternative substrates, new strategies. *Biosurfactants*, 170-184.

Bhowmick, M., Tamizharasi Sengodan, D., y Thangavel, S. (2014). Evaluation and characterization of transdermal therapeutic systems: an exhaustive pictorial and figurative review.

Bolzinger, M. A., Briançon, S., Pelletier, J., y Chevalier, Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*, 17(3), 156-165.

Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., y Simon, M. (1986). Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: use of excised human skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(11), 1094-1097.

Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., y Storm, J. E. (1989). Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 99(3), 534-543.

Brown, M. J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science*, 13(2), 61-64.

Cater, K. C., y Harbell, J. W. (2006). Prediction of eye irritation potential of surfactant-based rinse-off personal care formulations by the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 25(3), 217-233.

CCB. (2019). Industria cosmética y de aseo retoma rumbo de crecimiento. Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://www.ccb.org.co/Clusters/Cluster-de-Cosmeticos/Noticias/2018/Marzo-2018/Industria-cosmetica-y-de-aseo-retoma-rumbo-de-crecimiento>. Consultado: 13/7/2019

Chemspider. (2018). Recuperado de: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7985479.html?rid=f680c0ab-b433-48a1-90a9-743f8ac06389&page_num=0. Consultado: 6/7/2019.

Christova, N., Tuleva, B., Kril, A., Georgieva, M., Konstantinov, S., Terziyski, I., ... y Stoineva, I. (2013). Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(3), 676-689.

Clarke, R. J., y Macrae, R. (Eds.). (1988). *Coffee: Chemistry* (Vol. 1). Springer Science y Business Media.

CLS. (2018). HaCat [fotografía]. Recuperado de: http://www.clsgmbh.de/p800_HaCaT.html. Consultado: 6/7/2019.

Comunidad Andina de Naciones. (26 de noviembre de 2018, Decisión 833). Armonización de legislaciones en materia de productos cosméticos. [Decisión 516 de 2002].

Dabboue, H., Builles, N., Frouin, É., Scott, D., Ramos, J., y Marti-Mestres, G. (2015). Assessing the impact of mechanical damage on full-thickness porcine and human skin using an In Vitro approach. *BioMed Research International*, 2015.

Davies, D. J., Ward, R. J., y Heylings, J. R. (2004). Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for in vitro percutaneous absorption studies. *Toxicology In vitro*, 18(3), 351-358.

Dimieri, L. (2015). Aspectos físicos de la visión humana (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Sur, Argentina.

Effendy, I., y Maibach, H. I. (1995). Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 33(4), 217-225.

EFSA Scientific Committee, Hardy, A., Benford, D., Halldorsson, T., Jeger, M. J., Knutsen, K. H., ... y Ockleford, C. (2017). Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal*, 15(1), e04658.

Eskes, C. (2005). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects. A report prepared in the context of the 7th amendment to the cosmetics

directive for establishing the timetable for phasing out animal testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33, 1-228.

EURL ECVAM. (2018a). DB-ALM Protocol nº 37: Red Blood Cell (RBC) Test System. Recuperado de: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/method-summary/1916/cell-transformation-assay-with-balb-c-3t3-cells-\(balb-c-3t3-cta\)-summary/datasheet](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/method-summary/1916/cell-transformation-assay-with-balb-c-3t3-cells-(balb-c-3t3-cta)-summary/datasheet). Consultado: 6/7/2019.

EURL ECVAM. (2018b). DB-ALM Protocol nº 139: Neutral Red Uptake (NRU) Biossay Using BALB/c 3T3 Cells. Recuperado de: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/1527/balb-c-3t3-neutral-red-uptake-cytotoxicity-assay-\(3t3-nru\)/datasheet](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/1527/balb-c-3t3-neutral-red-uptake-cytotoxicity-assay-(3t3-nru)/datasheet) . Consultado: 6/7/2019.

EURL ECVAM. (2018c). DB-ALM Protocol nº17: MTT assay. Recuperado de: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocols/protocol/mtt-assay/protocol-no/17/key/p_605. Consultado: 6/7/2019.

EURL ECVAM. (2018d). DB-ALM Protocol nº64: Neutral Red Uptake (NRU) Cytotoxicity Assay. Recuperado de: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/652/neutral-red-uptake-\(nru\)-cytotoxicity-assay/datasheet](https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocol/652/neutral-red-uptake-(nru)-cytotoxicity-assay/datasheet) . Consultado: 6/7/2019.

[EWG's Skin Deep Cosmetic Database. \(2019\). Exposures add up – Survey results](https://www.ewg.org/skindeep/2004/06/15/exposures-add-up-survey-results/). Recuperado de: <https://www.ewg.org/skindeep/2004/06/15/exposures-add-up-survey-results/> . Consultado: 6/7/2019.

Public Law 110-85 Federal Food and Drug and Cosmetic Act, Diario Oficial del Gobierno de los Estados Unidos, Washington, USA, 7 de septiembre de 2007.

Förester, T., Waldmann-Laue, M., Both W. and Jassoy, C . (1999). Lipoprotein creams: Utilization of multifunctional ingredients for preparation of cosmetic emulsion with excellent skin compatibility. *International Journal of Cosmetic Science*. 21:253–264.

Franz, T. J. (1990). Percutaneous Absorption: Mechanisms—Methodology—Drug Delivery. *Archives of Dermatology*, 126(10), 1384-1384.

Gharaei-Fathabad, E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 58-69.

Godin, B., y Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), 1152-1161.

Hartung, T. (2008). Food for thought... on alternative methods for cosmetics safety testing. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 25(3), 147-162.

Hitzler, M., Bergert, A., Luch, A., y Peiser, M. (2013). Evaluation of selected biomarkers for the detection of chemical sensitization in human skin: a comparative study applying THP-1, MUTZ-3 and primary dendritic cells in culture. *Toxicology In vitro*, 27(6), 1659-1669.

ICCVAM. (2006). *Introduction and rationale for the proposed use of in vitro test methods to identify ocular corrosives and severe irritants* [PDF file]. Disponible en: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/ocubrd/hetcam/hetcam1.pdf. Consultado: 6/7/2019.

ICCVAM. (2010). *ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method* [PDF file]. Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>. Consultado: 6/7/2019.

ICH, (2005). Validation of analytical procedures Q2(R1). November 2005. Disponible en: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Consultado: 4/7/2019

Jensen, J. K., Holm, P. E., Nejrup, J., y Borggaard, O. K. (2011). A laboratory assessment of potentials and limitations of using EDTA, rhamnolipids, and compost-derived humic substances (HS) in enhanced phytoextraction of copper and zinc polluted calcareous soils. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 20(7), 777-789.

-
- Jiang, L., Long, X., y Meng, Q. (2013). Rhamnolipids enhance epithelial permeability in Caco-2 monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 446(1-2), 130-135
- Jiang, L., Shen, C., Long, X., Zhang, G., y Meng, Q. (2014). Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10187-10196.
- Jiménez, D., Medina, S. A., Gracida, J. N. (2010). Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos: una revisión. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(1), 65-84.
- Johann, S., Seiler, T. B., Tiso, T., Bluhm, K., Blank, L. M., y Hollert, H. (2016). Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Science of the Total Environment*, 548, 155-163.
- Kandárová, H., y Letašiová, S. (2011). Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 107-113.
- Kanlayavattanakul, M., y Lourith, N. (2010). Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 32(1), 1-8.
- Kapoor, S., y Saraf, S. (2008). Risk analysis tools for toxicological profile of cosmetics. *The Internet Journal of Toxicology*, 5(2).
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, S. B., Oh, H. M., Kwon, T. J., y Yoon, B. D. (2002). Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24(19), 1637-1641.
- Kirschenbaum, D. M. (1973). Molar absorptivity and $A_{1cm}^{1\%}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. VIII. *Analytical biochemistry*, 55(1), 166-192.

Kobayashi, H., y Kohshima, S. (1997). Unique morphology of the human eye. *Nature*, 387(6635), 767.

Korting, H. C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kersch, M., Angerpointner, T., y Maibach, H. I. (1994). Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *Journal of Dermatological Science*, 7(2), 119-129.

Kroes, R., Renwick, A. G., Feron, V., Galli, C. L., Gibney, M., Greim, H., ... y Van de Sandt, J. J. M. (2007). Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2533-2562.

Law No. 145 Japan Pharmaceutical Affairs Law, Dieta Nacional, Shūgin, Japón, mayo 24 de 2013.

Lee, J. K., Kim, D. B., Kim, J. I., y Kim, P. Y. (2000). In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in vitro*, 14(4), 345-349.

Lewis, M. A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Research*, 25(1), 101-113.

Ley No. 120C, 2018. Gaceta del congreso N° 679, Bogotá, Colombia. 05 de diciembre de 2018.

Lourith, N., y Kanlayavattanukul, M. (2009). Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *International Journal of Cosmetic Science*, 31(4), 255-261.

Lukic, M., Pantelic, I., y Savic, S. (2016). An overview of novel surfactants for formulation of cosmetics with certain emphasis on acidic active substances. *Tenside Surfactants Detergents*, 53(1), 7-19.

Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology.

Ma, K. Y., Sun, M. Y., Dong, W., He, C. Q., Chen, F. L., y Ma, Y. L. (2016). Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 144-151.

Martin, R. J., Denyer, S. P., y Hadgraft, J. (1987). Skin metabolism of topically applied compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 39(1-2), 23-32.

Martinez, V., Corsini, E., Mitjans, M., Pinazo, A., y Vinardell, M. P. (2006). Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different *in vitro* endpoints as alternatives to the *in vivo* assays. *Toxicology Letters*, 164(3), 259-267.

Masson, P. (Septiembre de 2018). Evaluación de la seguridad de ingredientes y formulaciones cosméticas. Programa Safe+ ONUDI. Presentación llevada a cabo en Bogotá, Colombia.

McDougal, J. (2008). Estimation of subsequent systemic exposure – physiological models. En Roberts, M., Walters, K., *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd edición, (pp. 17-35). New York, USA. Informa Healthcare USA.

McNamee, P., Hibatallah, J., Costabel-Farkas, M., Goebel, C., Araki, D., Dufour, E., ... y Macfarlane, M. (2009). A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 54(2), 197-209.

Mehling, A., Kleber, M., y Hensen, H. (2007). Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 747-758.

Monteiro-Riviere, N., Baynes, R., Riviere, J. (2008). Animal Skin Morphology and dermal absorption. En Roberts, M., Walters, K., *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd edición, (pp. 17-35). New York, USA. Informa Healthcare USA

Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O., y Riviere, J. E. (2011). Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide

nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences*, 123(1), 264-280.

Moore, A. F. (1983). Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulphate and ammonium lauryl sulphate. *Journal of the American College of Toxicology*, 2, 127-181.

Morita, T., Kitagawa, M., Yamamoto, S., Sogabe, A., Imura, T., Fukuoka, T. and Kitamoto, D. (2010). Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair. *Journal of Oleo Science*, 59, 267–272.

Mukhtar, H. A. S. A. N., y Bickers, D. R. (1981). Drug metabolism in skin. Comparative activity of the mixed-function oxidases, epoxide hydratase, and glutathione S-transferase in liver and skin of the neonatal rat. *Drug Metabolism and Disposition*, 9(4), 311-314.

Nguyen, V. T., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Kitajima, Y., y Grando, S. A. (2003). Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sciences*, 72(18-19), 2081-2085.

Nguyen, T. T., Youssef, N. H., McInerney, M. J., y Sabatini, D. A. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*, 42(6-7), 1735-1743.

Nguyen, T. T. and Sabatini, D. A. (2009). Formulating Alcohol-Free Microemulsions Using Rhamnolipid Biosurfactant and Rhamnolipid Mixtures. *Journal of Surfactants Detergents*, 12:109 – 115.

Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T., y Toutain, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 239-259.

Norlen, L. (2008). The physical structure of the skin barrier. En Roberts, M., Walters, K. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd edición, (pp. 37-68). New York, USA. Informa Healthcare US.

OECD, (2004a). OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Number 28. Adopted March 2004. pp. 22.

OECD. (2004b). OECD guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: *in vitro* method. Guideline 428. Adopted 13 april 2004. pp. 1-8.

OECD. (2011). OECD Guidance notes on dermal absorption. Number 156. August 18 2011

OECD. (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. pp.22

OECD. (2017). OECD guideline for the testing of chemicals. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemical inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Guideline 437. Adopted 9 october 2017. pp. 1-30.

ONUUDI. (2018). Curso formación para evaluador de seguridad de productos cosméticos. Tomo 1. Bogotá D.C., Colombia.

Paeratakul, O. (2002). Chapter 9: Disperse Systems. En: Banker, G.S., Rhodes, C.P. *Modern Pharmaceutics*, 4th edición, (pp. 385-386). New York, USA. Marcel Dekker.

Pape, W. J., y Hoppe, U. (1990). Standardization of an *in vitro* red blood cell test for evaluating the acute cytotoxic potential of tensides. *Arzneimittel-Forschung*, 40(4), 498-502.

Pape, W. J., y Hoppe, U. (1991). *In vitro* methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. *Skin Pharmacology and Physiology*, 4(3), 205-212.

Pape, W. J. W., Pfannenbecker, U., Argembeaux, H., Bracher, M., Esdaile, D. J., Hagino, S., ... y Lewis, R. W. (1999). COLIPA validation project on *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status. *Toxicology in Vitro*, 13(2), 343-354.

Patowary R, Patowary K, Kalita MC, Deka S. (2016). Utilization of paneer whey waste for cost-effective production of rhamnolipid biosurfactant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180, 383–399.

Pemegear. (2017). Franz Flow Cells. Disponible en: <http://permegear.com/franz-cells/>.

Consultado: 6/7/2019.

Perinelli, D. R., Vllasaliu, D., Bonacucina, G., Come, B., Pucciarelli, S., Ricciutelli, M., ... y Casettari, L. (2017). Rhamnolipids as epithelial permeability enhancers for macromolecular therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 419-425.

Petrović, M., Gonzalez, S., y Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685-696.

Pinzón, N. M., y Ju, L. K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5), 975-981.

Poet, T. S., y McDougal, J. N. (2002). Skin absorption and human risk assessment. *Chemico-Biological Interactions*, 140(1), 19-34.

Rebello, S., Asok, A. K., Mundayoor, S., y Jisha, M. S. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12(2), 275-287.

Reglamento (CE) N° 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre productos cosméticos. 30 de Noviembre de 2009.

Reuter, H., Spieker, J., Gerlach, S., Engels, U., Pape, W., Kolbe, L., ... y Reisinger, K. (2011). In vitro detection of contact allergens: development of an optimized protocol using human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 315-323.

Rieger, M.N. (1997). Surfactant chemistry and classification. En Rieger, M.N. and Rhein, L.D. *Surfactants in Cosmetics*, 2nd edición, (pp. 2). New York, USA. Mercel Dekker.

Rigort, A., Grünewald, J., Herzog, V., y Kirfel, G. (2004). Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration. *European Journal of Cell Biology*, 83(11-12), 725-733.

Roberts, M., Walters, K. (2008). Human Skin Morphology and Dermal Absorption. En Roberts, M., Walters, K., *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 2nd edición, (pp. 1-15). New York, USA. Informa Healthcare USA.

Sánchez, L., Mitjans, M., Infante, M. R., y Vinardell, M. P. (2004). Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1637-1641.

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., y Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.

Sato, K., Sugibayashi, K., y Morimoto, Y. (1991). Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(2), 104-107.

SCCS. (2012). Use of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) Approach for Human Safety Assessment of Chemical Substances with focus on Cosmetics and Consumer Products. [PDF file]. Disponible en:

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_092.pdf.

Consultado: 6/7/2019.

SCCS. (2015). The SCCS notes of guidance for testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation. [PDF file]. Disponible en:

http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf.

Consultado: 6/7/2019.

Schaefer, H.; Redelmeier, T.E. (1996). In: *Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption*. Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., Eds.; Karger: Basel; pp. 56-59.

Schmook, F. P., Meingassner, J. G., y Billich, A. (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 215(1-2), 51-56.

Scott, M. J., y Jones, M. N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1508(1-2), 235-251.

Sekhon Randhawa, K. K., y Rahman, P. K. (2014). Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 5, 454.

So, J., Ahn, J., Lee, T. H., Park, K. H., Paik, M. K., Jeong, M., ... y Jeong, S. H. (2014). Comparison of international guidelines of dermal absorption tests used in pesticides exposure assessment for operators. *Toxicological Research*, 30(4), 251.

Steiling, W., Kreutz, J., y Hofer, H. (2001). Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes in vitro. *Toxicology in vitro*, 15(4-5), 565-570.

Stipcevic, T., Piljac, T., y Isseroff, R. R. (2005). Di-rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* displays differential effects on human keratinocyte and fibroblast cultures. *Journal of Dermatological Science*, 40(2), 141-143.

Stipcevic, T., Piljac, A., y Piljac, G. (2006). Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns*, 32(1), 24-34.

Takahashi, Y., Koike, M., Honda, H., Ito, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., y Nishiyama, N. (2008). Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicology in vitro*, 22(3), 760-770.

Takahashi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T. and Kitamoto, D. (2012). Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. *Journal of Oleo Science*, 61, 457–464.

Takeuchi, S., y Kwon, S. (2017). In Vitro Methods for Predicting Ocular Irritation. *In Vitro Toxicology*, 209.

Thomsen, V., Schatzlein, D., y Mercurio, D. (2003). Limits of detection in spectroscopy. *Spectroscopy*, 18(12), 112-114.

Van de Sandt, J., Roguet, R., Cohen, C., Esdaile, D., Ponec, M., Corsini, E., ... y de Fraissinette, A. D. B. (1999). The use of human keratinocytes and human skin models for predicting skin irritation. *ATLA-NOTTINGHAM-*, 27, 723-744

Vecino, X., Cruz, J. M., Moldes, A. B., y Rodrigues, L. R. (2017). Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-16.

Vinardell, M. P., y Mitjans, M. (2008). Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), 46-59.

Xie, Y., Li, Y. and Ye, R. (2005). Effect of Alcohols on the Phase Behavior of Microemulsions Formed by a Biosurfactant – Rhamnolipid. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 26, 455–461.

Yan, X., Piferski, C., y Nitka, S. (2007). Evaluation of the Hen's Egg Test–Chorioallantonic Membrane (CAM) Method in Prediction of the Eye Irritation Potential Formulated Personal Wash Products. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26(1), 25-36.

Ward, R. K., Hubbard, A. W., Sulley, H., Garle, M. J., y Clothier, R. H. (1998). Human keratinocyte cultures in an *in vitro* approach for the assessment of surfactant-induced irritation. *Toxicology in vitro*, 12(2), 163-173.

Wilhelm, K. P., Böttjer, B., y Siegers, C. P. (2001). Quantitative assessment of primary skin irritants *in vitro* in a cytotoxicity model: comparison with *in vivo* human irritation tests. *British Journal of Dermatology*, 145(5), 709-715.

Wilkinson, S.C. (2008). In: *Principles and Practice Skin Toxicology*; Chilcott, R.P. and Price, S., Eds.; John Wiley y Sons: Chichester; pp. 69-82.