

REFERENCIA DEL ESTUDIO 01/IC-EPI_150_15-001

Informe del Estudio – Versión nº 1


ENSAYO DE IRRITACIÓN DE LA PIEL IN VITRO PRODUCIDO POR UN PRODUCTO COSMÉTICO



CLIENTE: NUTRITAPE, S.L.

PRODUCTO ANALIZADO: L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA Y L-VALINA

REFERENCIA: BCAA

	Nombre	Cargo	Firma	Fecha
Verificado y aprobado por	Irene Zaldívar Notario	Director del laboratorio		17/09/2015

Este informe contiene 11 páginas.

ÍNDICE DEL INFORME

1. OBJETIVO Y PRINCIPIO DEL ESTUDIO	3
2. CENTRO INVESTIGADOR.....	4
3. CALENDARIO DE EJECUCIÓN DEL ENSAYO	4
4. PRODUCTO ANALIZADO	4
4.1 Identificación de producto	4
4.2 Información del producto.....	5
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	5
5.1 Medios y soluciones.....	5
5.2 Equipamiento.....	5
5.3 Producto de referencia	5
5.4 Ensayo y preparación de productos de referencia	6
5.5 Sistema experimental	6
5.5.1. Preparación del sistema experimental.....	6
5.6 Ensayo de irritación de la piel in vitro	6
6. RESULTADOS	8
7. EVALUACIÓN	9
8. CONCLUSIÓN	11
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11

1. OBJETIVO Y PRINCIPIO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio toxicológico es la evaluación del potencial irritante de los productos cosméticos L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA Y L-VALINA, (referencia BCAA). Se utilizó un modelo experimental de piel humana como sistema experimental (RHE proporcionado por laboratorios SkinEthic).

Para alcanzar el objetivo del estudio, el modelo experimental fue tratado con los productos de ensayo de acuerdo con la OECD 439.

La valoración de la irritación de la piel por un compuesto puede ser estudiada in vitro mediante la medida de viabilidad celular de un epitelio epidérmico humano reconstruido tras la aplicación tópica de un producto. El modelo humano experimental in vitro empleado en este estudio fue el RHE (Epidermis humana reconstituida), proporcionada por laboratorios SkinEthic. Este modelo consiste de queratinocitos humanos normales cultivados sobre un filtro de policarbonato inerte, en un medio químico definido. Después de 17 días de incubación, se obtiene un modelo de epidermis humana tridimensional, la cual consta de al menos una epidermis reconstruida con varias capas de células epidérmicas y un estrato córneo con función de barrera.

Con el objeto de evaluar la irritación in vitro de la piel producida por los productos experimentales, se siguió la guía para ensayo con químicos OECD 439 (test de irritación in vitro de la piel). Tejido humano epitelial reconstituido fue expuesto por triplicado a 16 mg de cada producto de forma tópica durante 42 minutos; acto seguido, los tejidos fueron aclarados con PBS e incubados durante 42 horas. Al final del tiempo de exposición, la viabilidad de las células de los tejidos tratados fue determinada mediante un ensayo MTT. Se realizó un único ensayo por tejido.

2. CENTRO INVESTIGADOR

ZURKO RESEARCH S.L.

Almansa, nº 110, local 18.

28040 Madrid (España)

Tel: (+34) 91.521.15.88

3. CALENDARIO DE EJECUCIÓN DEL ENSAYO

Inicio de la Fase Experimental: 7 de Septiembre del 2015

Finalización de la Fase Experimental: 10 de Septiembre del 2015

4. PRODUCTO ANALIZADO

4.1 Identificación de producto

PRODUCTO

L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA Y L-VALINA

Referencia del producto

BCAA

Lote del producto

L201501290103, Y20140423,
X20140425

Referencia estudio Zurko
Research

01/IC-EPI_150_15-001

Forma Cosmética y
Características Organolépticas

Polvo blanco

Forma y contenido del envase

3 paquetes plásticos de 50 g

El producto testado se almacenó a temperatura ambiente siguiendo las especificaciones del proveedor.

La identidad y estabilidad del producto testado se encuentran en el formulario de información del producto proporcionado por Laboratorios NUTRITAPE, S.L.

4.2 Información del producto

Los documentos relacionados con el producto testado que acompañan a la muestra son la fórmula cualitativa y la carta de compromiso del proveedor, que hace referencia en particular a la coherencia de la fórmula con las normas vigentes, y su seguridad.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Medios y soluciones

Durante el desarrollo del ensayo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Medio de mantenimiento. Laboratorios SkinEthic. Ref: SMM.
- Medio de cultivo. Laboratorios SkinEthic. Ref: SGM.
- MTT. CAS No 298-93-1. Sigma M2128.
- Isopropanol CAS N° 67-63-0. Panreac. Ref: 131090.1611.
- PBS (1X) Roche 1666789001. Una solución de PBS 1X en agua destilada fue preparada para el ensayo de irritación de la piel in vitro. Fue usado como control negativo.

5.2 Equipamiento

- Pipetas automáticas.
- Balanza analítica.
- Cronómetro.
- Baño termostático con agitación.
- Congelador.
- Incubadora CO₂.
- Cabina de flujo laminar.
- Lector de placas ELISA.
- Equipo Mili-Q Water.
- Agitador orbital.

5.3 Producto de referencia

El producto de referencia positiva para el test de irritación de la piel in vitro fue el siguiente:

- Producto de referencia positiva: Sodium Dodecyl Sulphate (SDS). CAS No 151-21-3 SIGMA L6026.

5.4 Ensayo y preparación de productos de referencia

Los productos de estudio fueron ensayados sin diluir y aplicados al sistema de estudio con una dosis final de 16 mg/tejido.

Se preparó una solución de SDS al 5% en agua destilada para el test de irritación de la piel in vitro.

5.5 Sistema experimental

Para el test de irritación de la piel in vitro, el modelo RHE proporcionado por laboratorios SkinEthics (Referencia: RHE/S/17. Lote N°: 15-RHE-113) fue utilizado como sistema experimental. Este modelo consiste de queratinocitos humanos normales cultivados sobre un filtro de policarbonato inerte, en un medio químico definido. Después de 17 días de incubación, se obtiene un modelo de epidermis humana tridimensional, la cual consta de al menos una epidermis reconstruida con varias capas de células epidérmicas y un estrato córneo con función de barrera.

5.5.1. Preparación del sistema experimental.

El sistema experimental fue mantenido en medio de cultivo, en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂, durante dos horas antes de la realización del ensayo.

5.6 Ensayo de irritación de la piel in vitro

Interacción MTT:

Antes de la realización del ensayo, se realizó un test de interacción MTT para identificar si los productos de ensayo son reductores directos de MTT. Se añadieron 16 ± 2 mg de cada uno de los productos de ensayo a 300 μ l de solución de MTT (1 mg/ml) recién preparada, y se incubaron durante 3 horas \pm 5 minutos a 37°C, 5% CO₂. Si la mezcla de MTT con los productos de ensayo permanece de color amarilla, los productos de ensayo no interactúan con el MTT. Sin embargo, si la mezcla de MTT con los productos se vuelve de color azul/morada, se asume que los productos de ensayo reducen el MTT de forma directa.

Ensayo de irritación de la piel:

Antes de la realización del ensayo de irritación de la piel, los injertos conteniendo epitelio humano reconstituido fueron depositados en 300 μ l de medio de mantenimiento e incubados durante 2 horas a 37°C, 5% CO₂. 16 ± 2 mg de cada uno de los productos de ensayo así como 16 ± 0.5 μ l de los controles correspondientes, PBS y SDS (5%), fueron aplicados de forma tópica en cultivos de tejido por triplicado. Los tejidos fueron incubados por 42 ± 1 minutos a temperatura ambiente. Al final del tiempo de exposición, los tejidos fueron aclarados en PBS y la epidermis se incubó a

37°C, 5% CO₂ por 42 ± 1 horas. La viabilidad de las células fue evaluada mediante la incubación de los tejidos en solución MTT (1 mg/ml) durante 3 horas ± 5 minutos a 37°C, 5% CO₂.

Después de la incubación, los cristales de formazán fueron extraídos usando isopropanol y cuantificados por espectrofotometría a 570 nm de longitud de onda. Por cada tejido tratado, la viabilidad celular fue calculada.

La viabilidad celular se expresó en porcentaje promedio (± desviación estándar de los tejidos por triplicado) de los tejidos control negativo (NC). La viabilidad celular fue calculada de la siguiente manera:

La densidad óptica (OD) promedio fue calculada para cada tejido (3 réplicas) y condición. La OD obtenida en el blanco ((OD blanco)) fue restada a la obtenida.

OD producto de ensayo = OD producto de ensayo - OD blanco

OD control negativo = OD control negativo - OD blanco

El % de viabilidad fue calculado de la siguiente manera:

% de viabilidad = [OD promedio del producto de ensayo / OD promedio del control negativo] x 100.

6. RESULTADOS

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial irritante de la piel de unos productos cosméticos.

Los resultados obtenidos en el test de interacción MTT muestran que los productos de ensayo L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA Y L-VALINA no interactúan con el MTT, con la mezcla de MTT permaneciendo de color amarillo (datos no mostrados).

% de viabilidad del epitelio reconstituido (expresado como % del control negativo) después del tratamiento				
Producto	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio ± SD
L-LEUCINA	98.47%	80.87%	90.50%	89.95 ± 9.12
L-ISOLEUCINA	86.22%	75.97%	100.89%	87.69% ± 10.88
L-VALINA	103.21%	97.74%	103.70%	101.55% ± 2.99
SDS	1.00%	1.04%	1.32%	1.12% ± 0.16%

Tabla 1. Los resultados son expresados como promedio ± desviación estándar (SD). % de viabilidad del epitelio reconstituido (expresado como % del control negativo) después del tratamiento.

7. EVALUACIÓN

Una sustancia de ensayo es considerada irritante para la piel si la viabilidad relativa promedio después del tiempo de exposición y el tiempo de incubación es menor o igual (\leq) al 50% del control negativo. El modelo predictivo es descrito en la siguiente tabla:

Criterios para la clasificación de un producto de ensayo	
Viabilidad del tejido (%)	Clasificación
Viabilidad del tejido promedio \leq 50%	Irritante (I)
Viabilidad del tejido promedio $>$ 50%	No irritante (NI)

Tabla 2. Criterios para la clasificación de un producto de ensayo.

De acuerdo con los resultados de este estudio, los productos de ensayo pueden ser clasificados de la siguiente manera.

Clasificación de los productos de ensayo		
Producto	Viabilidad del tejido promedio (%)	Clasificación
L-LEUCINA	89.95 \pm 9.12	NI
L-ISOLEUCINA	87.69% \pm 10.88	NI
L-VALINA	101.55% \pm 2.99	NI
SDS	1.12% \pm 0.16%	I

Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar. NI: No irritante. I: irritante.

Tabla 3. Clasificación de los productos de ensayo.

Los resultados obtenidos indican que los productos de ensayo L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA y L-VALINA son clasificados como productos de ensayo no irritantes para la piel, en las condiciones del ensayo.

El estudio sigue los criterios de aceptación establecidos en la PNT E 0101. R03:

- El valor de OD promedio del NC fue 1.74% (≥ 1.2), y estuvo dentro de los valores históricos del laboratorio que fueron establecidos como criterios de aceptación del ensayo de irritación de la piel in vitro (promedio OD: 1.74% Rango: 1.01-2.46).
- La viabilidad promedio para el producto referencia positivo SDS (expresada como % del NC) fue de 1.12 (< 40%), y estuvo dentro de los valores históricos del laboratorio que fueron establecidos como criterios de aceptación del ensayo de irritación de la piel in vitro (% promedio de viabilidad: 1.96% Rango: 0.26-3.66).
- La desviación estándar de las réplicas de tejido fue de 10.14%, 12.40%, y 2.95% para los productos de ensayo L-LEUCINA, L-ISOLEUCINA y L-VALINA respectivamente, y de 13.87% para el producto referencia positivo (SDS), de acuerdo a los criterios de aceptación de la OECD 439 ($\leq 18\%$).

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que los productos de ensayo **L-LEUCINA**, **L-ISOLEUCINA** Y **L-VALINA** fueron no irritantes en las condiciones del estudio.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD 439. In vitro Skin Irritation.
2. SKINETHIC SKIN IRRITATION TEST 42bis. TEST METHOD FOR THE PREDICTION OF ACUTE SKIN IRRITATION OF CHEMICALS: 42 MINUTOS APPLICATION + 42 HOURS POST-INCUBATION. SKINETHIC SKIN IRRITATION TEST 42bis Standard Operation Procedure (SOP).