

## **Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico** (Evaluation of ophthalmic, dermal irritability and the sensitizing effect of OLEOZON® Tópico)

**Díaz Maritza F.<sup>1</sup>, García Gastón<sup>2</sup>, García Kendra<sup>1</sup>, Sánchez Yaima<sup>1</sup> y Tillan Juana<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 230 y ave 15, Siboney, Playa, C. de La Habana, Cuba. [maritza.diaz](mailto:maritza.diaz). <sup>2</sup>Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL), <sup>3</sup>Departamento de Control Biológico, Centro de Investigaciones de Desarrollo de Medicamentos CIDEM.

E-mail: [maritza.diaz@cnic.edu.cu](mailto:maritza.diaz@cnic.edu.cu)

### **Resumen**

Se realizó un estudio para determinar la posible irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del aceite de girasol ozonizado OLEOZON® Tópico. Los ensayos se llevaron a cabo en conejos y curieles con las técnicas descritas en los procedimientos normalizados de trabajo establecidos en el Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas de la Universidad de La Habana. El OLEOZON® Tópico no resulta irritante en la piel de los conejos ensayados ni en las estructuras oculares de los conejos evaluados y no tiene efecto sensibilizante al ponerse en contacto con la piel de los curieles sometidos al estudio; por lo que puede afirmarse que cumple con los requisitos indispensables para ser aceptado como medicamento y ser utilizado en las afecciones de la epidermofitosis e impétigo.

**Palabras claves:** OLEOZON® Tópico, aceite de girasol ozonizado, irritabilidad dérmica, irritabilidad oftálmica, ensayo de sensibilización.

### **Abstract**

A study was realized to determine the possible dermal and ophthalmic irritability and the sensitizing effect of the ozonized sunflower oil OLEOZON® Topic. The trial was conducted in rabbits and guinea pigs and the techniques described in the standardized procedures of the work established by the Center of Biological Research and Evaluations from Pharmacy and Food Institute of Havana University were used. The OLEOZON® Topic does not irritate de skin of the assayed rabbits and not have irritate effect in the ocular structures on the evaluated rabbits and has not sensitizing effect on contacting the skin of the guinea pigs included in the study. Therefore, can be affirmed it obeys the indispensable requirements for the acceptance with drug and for it is used in the pathologies of epidermophytosis and impetigo.

**Keys Words:** OLEOZON® Tópico, ozonized sunflower oil, rabbits, dermal irritability, ophthalmic irritability, sensitizing test.

## **Introducción**

El aceite de girasol ozonizado OLEOZON® Tópico es un producto que presenta actividad fungicida y antimicrobiana, es activo contra hongos productores de micosis superficiales en humanos tales como *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*, y contra *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus β-Hemolítico* del grupo A y diferentes especies de *Bacilos Gram negativos* (Menéndez y col. 2002), (Lezcano y col. 1998).

En los diferentes estudios pre-clínicos y clínicos que se le han realizado al OLEOZON® tópico y a las formulaciones que lo contienen como principio activo, éste ha demostrado tener numerosas propiedades de gran utilidad en la práctica médica actual (Acebedo y col. 1997), (Sánchez y col. 1998), (Falcón y col. 1998), (Sechi y col. , 2001), (Díaz y col. 2005).

Sin embargo, para su uso y comercialización se debe cumplimentar una serie de requisitos entre los que se encuentran los ensayos de irritabilidad dérmica, irritabilidad oftálmica y sensibilización, que garantizan dentro del margen de error que siempre trae aparejada la extrapolación del animal al hombre, que los productos que resulten no irritantes, no lo serán potencialmente en el hombre.

Por estas razones el presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del potencial irritante del OLEOZON® Tópico en la superficie ocular y su potencial irritante dérmico así como evaluar sus efectos sensibilizantes.

## **Materiales y Métodos**

Fueron evaluados tres ensayos de irritabilidad dérmica, oftálmica, y sensibilización. Las técnicas utilizadas en los ensayos se encuentran descritas en los procedimientos PNT/TEC/0207, PNT/TEC/0208, PNT/TEC/0209, establecidos en el Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL), así como en las guías de la OECD y las ISO (OECD, 1992), (ISO, 1996), (SOP, 1980).

### **Selección de los animales**

#### **Ensayos de Irritabilidad dérmica y oftálmica**

Para cada uno de estos ensayos se emplearon 3 conejos machos de la línea F<sub>1</sub>, procedentes del CENPALAB con su correspondiente certificado de salud (PNT/ANI000). Dichos conejos tenían un peso corporal entre 1,8 y 2,0 kg, según lo establecido en el PNT/ANI/009.

Los conejos se mantuvieron en aclimatización con agua y comida ad libitum, con un ciclo luz/oscuridad 12 x 12 horas, temperatura 22 ± 1°C y humedad 50 ± 5 % (PNT/ANI/011, PNT/ANI006, PNT/ANI/005).

#### **Ensayo de sensibilización**

En este ensayo se emplearon 30 curieles albinos de la línea Hartley, con sus correspondientes certificados de salud y un peso entre 300 y 400 g (PNT/ANI000). Los mismos fueron distribuidos en 20 curieles (10 hembras y 10 machos) para el grupo de tratamiento, así como 10 curieles (5 hembras y 5 machos) para el grupo control.

Los curieles se mantuvieron en cuarentena según los procedimientos de laboratorio (PNT/ANI/011) con acceso al agua y la comida ad libitum (PNT/ANI/006 y PNT/ANI 005).

### **Medicamento utilizado**

En todos los ensayos se utilizó el medicamento OLEOZON® Tópico (Díaz y col. 2004) con una semana de fabricado en el Centro de Investigaciones del Ozono con un índice de peróxido de 763 mmol-equiv/kg (BP, 2000). Además, se realizó un ensayo de irritabilidad dérmica con el mismo producto después de dieciocho meses y de tres años de mantenerse almacenado a una temperatura de 2 a 8 °C.

### **Ensayo de irritabilidad dérmica**

Para la realización de este ensayo los conejos fueron depilados a ambos lados de la columna vertebral 24 h antes de iniciarse el ensayo. Fueron tomados todos los cuidados para evitar que se erosionara la piel y solo aquellos animales con la piel intacta fueron utilizados. Posteriormente se seleccionaron los sitios de piel adecuados para el estudio y se aplicaron 0,5 mL del producto en un sitio de piel diferente de cada animal. El producto se mantuvo expuesto en el sitio de la piel cubierto con parche de gasa estéril y fijado con esparadrappo hipoalérgico durante 4 horas. Los animales permanecieron por 5 horas en el cepo para evitar su acceso al parche y que pudieran ingerir o inhalar el producto. A continuación se retiraron los parches y la zona de aplicación se lavó con solución salina fisiológica.

Se realizaron lecturas de las variables eritema y edema a los tiempos de 1, 24, 48 y 72 horas. La irritación dérmica fue registrada de acuerdo con la tabla descrita por Draize (Draize, 1994) y que aparece recogida en la norma de la (OECD,1992). Por otra parte, de encontrarse otro signo clínico también era registrado en los modelos habilitados al efecto.

El cálculo del Índice de Irritación Primario (IIP) se efectuó teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de las 24 h tal como se plantea en la norma (ISO, 1996), y dividiendo la suma de estos (resultados de 24h + 48h+ 72h), para eritema y edema entre 9, es decir tres conejos y tres días en que se realizaron las evaluaciones.

En caso de encontrarse alguna marcada reacción eritematosa o edematosa, se seleccionaban los órganos relacionados con el evento así como porciones de la piel tratada para su procesamiento histopatológico.

### **Ensayo de irritabilidad oftálmica**

En el ensayo de irritabilidad oftálmica se aplicó una dosis de 0,1 mL de OLEOZON® en el fondo del saco conjuntival del ojo derecho, que permaneció cerrado por espacio de 15 seg; en el ojo izquierdo no se aplicó producto alguno, tomándose a manera de control. Se realizaron evaluaciones de tres estructuras: la conjuntiva, el iris y la córnea, a los tiempos de 1, 24, 48 y 72 horas

Para el cálculo del IIO (Índice de Irritación Ocular) se determinó la suma de todas las observaciones que se encontraron en las tres estructuras analizadas (córnea, iris y conjuntiva), en los tiempos prefijados y este valor se dividió por 12 (3 estructuras, 4 tiempos de evaluación)

## **Ensayo de Sensibilización**

### **Etapa de inducción**

Los animales fueron depilados en un área dorsal de 4 x 6 cm, 24 horas antes de iniciar la etapa de inducción, la cual consistió en la aplicación de 0,5 mL de OLEOZON® en el dorso izquierdo con una gasa estéril y material adhesivo por un período de 48 horas. En los animales del grupo control se aplicó el aceite de girasol placebo de igual forma. En el área derecha se inyectó por vía intradérmica 0,1 mL de adyuvante completo de Freund, diluido al 50 % en cloruro de sodio al 0,9 %. Cada 48 horas se retira el parche, se observa la zona y se vuelve a aplicar la muestra y el placebo hasta completar un total de 7 aplicaciones. Durante esta etapa los animales deben ser depilados semanalmente. A partir de la retirada del último parche, se le permite al animal descansar por un período de 12 días.

### **Etapa de desafío**

Este período comienza a los 13 días de retirado el último parche, con la depilación de los animales en la parte inferior del dorso izquierdo y a las 24 horas se aplican las muestras de OLEOZON® o placebo, según corresponda, con parche oclusivo en la zona depilada. Pasadas las 48 horas se retira el parche y se procede a lavar la zona con cloruro de sodio al 0,9 % o agua estéril antes de realizar las observaciones de la piel a las 1, 6, 24 y 48 horas y evaluar la formación de edemas y eritemas según la escala Draize (Draize, 1994). El criterio mínimo de una reacción alérgica es el enrojecimiento. Las reacciones pueden ser clasificadas de acuerdo a la siguiente escala: No reacción 0, enrojecimiento ligero-difuso 1, enrojecimiento moderado 2, enrojecimiento intenso e inflamación 3.

## **Resultados y Discusión**

### **Ensayos de irritabilidad dérmica del OLEOZON® a los tiempos 1 semana, 18 y 36 meses de elaborados y almacenados a una temperatura de 2 a 8 °C.**

El día del ensayo, y durante los tres días posteriores se efectuaron lecturas de la piel para eritema, edema y escaras evaluándose por la tabla descrita por Draize. No se observaron alteraciones en las evaluaciones efectuadas después de haber quitado el parche, por lo que valor de índice de irritación fue de 0,0, lo que cataloga a los productos OLEOZON® como no irritante para la piel con una semana, 18 y 36 meses de elaborado (Tabla 1).

*Tabla 1. Ensayo de irritabilidad dérmica del OLEOZON® Tópico con diferentes tiempos de almacenamiento.*

PRODUCTO	EVALUACION (H)	IIP	CLASIFICACION
OLEOZON® Tópico 1 semana	1, 24, 48 y 72	0	No irritante
OLEOZON® Tópico 18 meses	1, 24, 48 y 72	0	No irritante
OLEOZON® Tópico 36 meses	1, 24, 48 y 72	0	No irritante

(H): Horas

IIP: Índice de irritabilidad primario

No se observaron otros signos clínicos en los animales sometidos al ensayo. No fue necesaria la toma de muestras de piel para el estudio histopatológico.

Este resultado reviste gran importancia pues este medicamento es de uso tópico y tiene un período de vigencia de 18 meses a la temperatura de 2 a 8 °C, lo que explica que el mismo puede ser utilizado sin que se produzca ningún producto colateral en su almacenamiento que irrite la piel.

### **Ensayos de irritabilidad oftálmica del OLEOZON®.**

En la tabla 2 se presentan las diferentes lecturas realizadas de las afecciones que se encontraron a una sumatoria de las distintas estructuras estudiadas (conjuntiva, iris y córnea) con el OLEOZON®, y el índice de irritación ocular.

**Tabla 2. Ensayo de irritabilidad oftálmica del OLEOZON® Tópico.**

HORAS	OBSERVACIONES							TOTAL
	CONJUNTIVA			CÓRNEA		IRIS		
	Eritema	Edema	Secreción	Área	Opacidad	+	-	
1	12	-	18	1	2	-	-	40
24	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-
Total								40
INDICE DE IRRITACION OCULAR								3,3

Se presentaron alteraciones en la conjuntiva y la córnea en los animales durante la primera hora del ensayo. No se observaron alteraciones en las diferentes estructuras del ojo ni a las 24, 48 y 72 horas de aplicado el medicamento. El índice de irritación ocular obtenido es de 3,3, por lo cual se considera el OLEOZON® Tópico como no irritante.

### **Ensayo de Sensibilización**

Ningún animal mostró a la observación reacción microscópica a la sensibilización, por lo que se le da la evaluación de 0, lo que significa que el OLEOZON® no es alergeno, por lo tanto no es un agente sensibilizante.

Con los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados en este trabajo se puede concluir que el OLEOZON® Tópico puede ser utilizado como tópico sin que se provoque irritación y reacción alérgica sobre la piel.

## Conclusiones

1. No se observaron alteraciones en la piel de los animales tratados con el OLEOZON® Tópico a la semana, 18 y 36 meses de elaborado. El índice de irritación primario fue en todos los casos de 0,0.
2. El OLEOZON® Tópico tiene un índice de irritación ocular de 3,3 por lo que se considera como no irritante.
3. No se encontró ningún animal sensibilizado, por lo que el OLEOZON® Tópico no es un agente potencialmente sensibilizante.
4. No se observaron otros signos clínicos en los animales estudiados en los ensayos.

## Bibliografía

1. Menéndez, S.; Falcón, L.; Simón, R.D.; Landa, N. (2002). Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses* 45:1-4.
2. Lezcano, I.; Molerio, J.; Gómez, M.; Contreras, R.; Roura, G.; Díaz, W. (1998). Actividad in vitro del OLEOZON frente a agents etiológicos de infecciones en la piel. *Rev. CENIC C. Biol.* 29(3):209-212.
3. Sánchez, A.; Díaz, P.; Rodríguez, G.; Leyva, E.; Díaz, E.; Borrego, L. (1998). Acción del aceite ozonizado sobre la cicatrización de heridas de piel en animales de experimentación. *Rev. CENIC C. Biol.* 29(3):181-184, 1998.
4. Falcón, L.; Menéndez, S.; Simón, R.; Garbayo, E.; Moya, S.; Abreu, M. (1998). Aceite ozonizado en dermatología. Experiencia de 9 años. *Rev. CENIC C. Biol.* 29(3):192-195.
5. Sechi, L.A.; Lezcano, I.; Nuñez, N.; Espim, M.; Dupre, I.; Pinna, A.; (2001). Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil (OLEOZON). *J. Appl. Microbiol.* 90(2):279-284.
6. Acevedo, A.; González, F.; Molerio, J.B.; González, A.; León, J. (1997). Ensayo de toxicidad subcrónica dérmica de 120 días del aceite ozonizado, OLEOZON, en ratas Cenp. *SPRD. Avan. Biot. Mod.* 4:T-4.
7. Díaz, MF.; Fernández, H.; Hernández, R.; Meneau, R.I.; Hernández, D. (2005). "Oleomasaje" un aceite ozonizado para masajes corporales. *Rev CENIC C. Biol.* 36:Número Especial.
8. Organization for Economic Co-operation and Development (1992): Guide for testing of chemical. Acute dermal irritation/Corrosion.
9. Standard Operating Procedures (1980). Inveresk Research International, Ltd. IRI. Edinburgh. Paget, G.E. and Thomson, R. *Toxicology*, Vol.1.
10. ISO 10993-10 (1996). Biological evaluation of medical devices. Part 10: Test for irritation and sensitization. European Committee for Standardization.
11. British Pharmacopoeia. (2000). Appendix XF, IA, IB. Peroxide value.
12. Díaz, M.F.; Fernández, H.; Dennis, P.; Hernández, R.; Martínez, G.; Hernández, D.; Menéndez, S.; Ledea, O.; Gómez, M. (2004). Renovación del Registro OLEOZON® Tópico, No. 1498, 536/02.039.04M.
13. Draize, J.H. (1994). Methods to the study of the irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and membranes. *J Pharm.* 2(3):8-12.

Trabajo recibido el 02/10/2006, nº de referencia [110615\\_RED.VET](#). Enviado por su autor principal.

Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 el 01/11/06.

[Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.® Se autoriza la difusión y envío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org](#) – [http://www.veterinaria.org/](#) y [REDVET®](#)

[http://www.veterinaria.org/revistas/redvet](#) v se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996 -2006