

# ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DERMICA DEL ACEITE OZONIZADO "OLEOZON" EN RATAS

G. Martínez Sánchez, O. Sonia León Fernández, C. Rodríguez Torres,\*  
N. Merino García,\*\* S. Sam Rodríguez, M. Ce deño Palenzuela  
y A. Acebo Mérida.\*\*\*

*Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana, Avenida 23 No. 21425 e/ 214 y 222, La Lisa. \* Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos, Avenida Independencia km 16 1/2, Santiago de las Vegas. \*\* Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana. \*\*\* Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, km 1 1/2, Finca Tirabeque, Bejucal, La Habana. Cuba.*

Recibido: 1ro de septiembre de 1996.

**RESUMEN.** El Oleozón (aceite de girasol ozonizado) es un medicamento de uso tópico, de reconocida eficacia terapéutica como germicida producido por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Fue evaluado en un ensayo de toxicidad aguda dérmica en ratas, con vistas a satisfacer los requerimientos para su registro como medicamento para uso humano. Se utilizó aceite de girasol no ozonizado como control y los grupos de animales se constituyeron de ocho ejemplares por sexo por grupo de tratamiento, los cuales fueron observados por 14 d. Durante el tratamiento, se controlaron diferentes variables para detectar la posible aparición de signos de toxicidad retardada. Adicionalmente, se realizó el estudio anatómico-patológico, hematológico y bioquímico de los animales, este último dirigido a conocer las alteraciones locales o sistémicas del sistema de reacciones oxidativas. Los resultados demostraron que la dosis de 2 000 mg/kg por vía dérmica, no produce letalidad y que tras la aplicación del Oleozón, no se originan signos tóxicos salvo eritema y edema en el sitio de aplicación, no aparecieron alteraciones a nivel sistémico a excepción de una modificación reversible de la actividad y coordinación motora de los machos a las 24 h. Estudios bioquímicos y hematológicos corroboraron estos resultados.

**ABSTRACT.** Oleozon (ozonized sun flower oil) is a topical medicine with recognized therapeutical efficiency as a germicide. This drug has been evaluated on an acute dermic toxicity assay on rats as a requirement to be registered as a medicine for human use. Groups of animals were formed by eight, each of them according to sex and type of treatment. They were observed for 14 d. During the treatment different parameters were taken into considerations to know the presence of retarded toxicity signs. Also, studies were carried out in anathomopathology, hemathology and biochemistry; the last one was directed to know the local or systemic alterations on the oxidative reaction system. The results proved that the dosis of 2 000 mg/kg weight, by dermic way, was not lethal. After the application of Oleozon, toxic signs did not appear only erithema and edema in treated areas. Systemic effects were not detected except for an alteration on coordination and motor activity in male animals, 24 h after the treatment. The biochemical and anatomopathological studies confirmed these results.

## INTRODUCCION

Los estudios de toxicidad aguda dérmica suministran información acerca de los posibles efectos adversos que ocasiona la exposición de un producto sobre la piel, esta información es utilizada además, como base para estudios crónicos y subcrónicos.<sup>1</sup>

El Oleozón es un aceite vegetal ozonizado, producido por el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, destinado a su aplicación tópica por su carácter germicida al cual, se le han realizado diferentes ensayos toxicológicos.<sup>2</sup>

Aunque el aceite de oliva ozonizado también se utiliza en la terapéutica, el aceite de girasol muestra ventajas en su comportamiento germicida.<sup>3</sup>

Es conocido que este medicamento produce cierta irritación en la piel,<sup>2</sup> condicionado probablemente por su mecanismo de acción, por lo que el objetivo de este trabajo consistió en desarrollar el ensayo agudo dérmico a dosis límite de 2 000 mg/kg de peso corporal (basado en el índice de peróxidos) para complementar la información toxicológica requerida para su registro médico.

## MATERIALES Y METODOS

### Procedimiento general

Se ensayó la dosis de 2 000 mg/kg (tomando como base el índice de peróxido, 506 mg/mL) sobre la piel de ratas. Se formaron dos grupos (uno control, tratado con aceite de girasol no ozonizado y otro de animales tratados con Oleozón) cada uno integrado por ocho animales de cada sexo. A las 24 h de aplicadas las sustancias en estudio, los animales fueron sometidos a un examen visual para detectar la posible formación de eritema y edema, la presencia o no de signos tóxicos y se tomaron tres animales por sexo por grupo para realizar estudios histopatológicos y bioquímicos. Posteriormente, se continuó la observación de los restantes durante 14 d al término de los cuales, se practicó la eutanasia y se tomaron tres animales por sexo por grupo para los estudios histopatológicos y bioquímicos.

### Animales

Se emplearon ratas Sprage-Dawley de ambos sexos, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, las cuales se mantuvieron 7 d antes del ensayo en el mismo local de trabajo, a una tem-

peratura de  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del  $(70 \pm 4) \%$  con libre acceso al aguayal os alimentos( pienso CEN-PALAB),ac iclosed el uz-oscuridad de 12x12hye n jaulas independientes.

**Peso.** El peso de los animales abarcó los intervalos siguientes:

Machos:  $(222,34 \pm 12,79)$  g

Hembras:  $(190,14 \pm 7,15)$  g

**Depilación.** El día anterior a la aplicación de la muestra, se rasuraron las zonas dorsales de los animales con una máquina de afeitar (3X4) cm y se incorporaron posteriormente, a sus respectivas jaulas.

**Aplicación.** La muestra se aplicó en forma de una película uniforme con ayuda de una jeringuilla hipodérmica. Después, la zona tratada se ocluyó por 24 h con una compresa de gasa que fue adherida con esparadrapo al pelo del animal. Tras la aplicación, los animales se situaron en sus jaulas correspondientes. A las 24 h, la zona tratada se limpió con solución jabonosa tibia y gasa, y posteriormente, con agua corriente.

### Observaciones

**Diarias.** Durante los 7 d previos al ensayo y los 14 d de su duración se registró: la temperatura y la humedad del local; los ciclo de luz-oscuridad; la posible aparición de signos tóxicos.<sup>4,5</sup>

**En días alternos.** Se registró el peso corporal y el consumo de agua y alimentos.

**Días0 ,1,7 ,14 .** Se registró la actividad motora en la caja de actividad (Ugo Basile, Milan, Italia) [tres animales de cada sexo por grupo, utilizando 5 min de adaptación y 5 min de medición( acumulativa)yc olocando los animales de forma independiente]; la coordinación motora mediante el Rota-Rod (Ugo Basile, Milan, Italia) (tres animales de cada sexo por grupo, utilizando 5 min de adaptación); la temperatura rectal empleando termómetro clínico (tres animales por sexo y por grupo); los reflejos flexorhomolateral, corneal y pineal y la respuesta al sobresalto según Irwin.<sup>6</sup>

**Días1,3 ,7 ,14 .** Se observó el sitio de aplicación para evaluar la posible ocurrencia de irritación cutánea (eritema y edema) y medir su magnitud según la escala de Draize, modificada por Ecobichon.<sup>4</sup>

### Exámenes clínicos

A los animales tomados a las 24 h y los restantes a los 14 d se les tomó muestras de sangre para determinar hemoglobina, hematocrito, conteo total de eritrocitos y leucocitos, conteo diferencial de leucocitos. Las enzimas mieloperoxidasa (MPO) con sustrato de o-dianisidina;<sup>7</sup> catalasa (CAT) a siguiendo la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm;<sup>8</sup> fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) utilizando lecitina de huevo como sustrato por el método espectrofotométrico;<sup>9</sup> peroxidasa (POD) utilizando como cromógeno el guayacol<sup>10</sup> y malonildialdehído (MDA), por la reacción del ácido tiobarbitúrico<sup>11</sup> se determinaron en suero de sangre tomada de la aorta abdominal, para lo cual se anestesiaron los animales con pentobarbital sódico en dosis de 40mg/ kg de peso por vía I.P.

Las determinaciones bioquímicas también se le realizaron a muestras de tejidos: piel, riñón e hígado, los cuales se homogeneizaron en disolución de NaCl 0,9 % a razón de 10m L por cada gramo de tejido, utilizando un homogeneizador de cuchillas Edmund Bühler HO4 (Alemania).

### Necropsia y estudios histopatológicos

La necropsia y los estudios histopatológicos se realizaron a todos los animales involucrados en el estudio. Se prestó especial atención a los órganos: músculo, bazo, riñón, hígado, ovarios-testículos, duodeno, ganglios linfáticos mesentéricos, ileon, próstata-útero, timo, corazón, pulmón, cerebro, glándulas adrenales, piel y médula ósea. Además, se realizó su estudio macromorfológico y se tomó el peso de los órganos correspondientes.

Los órganos objeto de estudio histopatológico fueron piel, hígado y riñón.

### Selección de los animales

Toda la selección de animales se realizó mediante el empleo de la tabla de números aleatorios.<sup>12</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Resultados de las observaciones de los signos tóxicos y otros indicadores

El peso corporal, consumo de alimentos y consumo de agua se comportó de forma semejante entre los grupos tratados y controles tanto a las 24 h, 7 y 14 d . No se encontraron diferencias significativas entre sus valores según el análisis de varianza ANOVA-UNO (Tabla I).

**TABLA I**  
**Comportamiento del peso corporal, consumo de pienso y agua de los animales durante el ensayo**

| Variable                           | Animales macho |                 |                |
|------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
|                                    | Tiempo         | Controles       | Tratados       |
| Peso corporal (g)                  | 24 h           | 218,00 ± 39,00  | 208,00 ± 10,00 |
|                                    | 7d             | 248,79 ± 21,39  | 245,70 ± 7,40  |
|                                    | 14 d           | 267,89 ± 20,90  | 275,85 ± 7,57  |
| Consumo de pienso [g/(animal . d)] | 24 h           | 16,79 ± 2,87    | 14,74 ± 2,40   |
|                                    | 7d             | 25,21 ± 4,4020  | ,82 ± 4,88     |
|                                    | 14 d           | 23,96 ± 2,55    | 24,64 ± 2,81   |
| Consumo de agua [mL/(animal . d)]  | 24 h           | 43,00 ± 2,00    | 37,00 ± 4,00   |
|                                    | 7d             | 33,00 ± 4,00    | 36,00 ± 5,00   |
|                                    | 14 d           | 32,00 ± 4,00    | 30,00 ± 3,00   |
| Animales hembra                    |                |                 |                |
| Peso corporal (g)                  | 24 h           | 183,82 ± 4,69   | 182,21 ± 4,69  |
|                                    | 7d             | 201,83 ± 9,65   | 203,73 ± 9,50  |
|                                    | 14 d           | 212,86 ± 10,51  | 212,60 ± 10,64 |
| Consumo de pienso [g/(animal . d)] | 24 h           | 10,76 ± 1,7012, | 27 ± 2,42      |
|                                    | 7d             | 20,37 ± 1,54    | 19,57 ± 3,12   |
|                                    | 14 d           | 12,85 ± 4,71    | 15,16 ± 2,73   |
| Consumo de agua [mL/(animal . d)]  | 24 h           | 24,00 ± 6,00    | 28,00 ± 5,00   |
|                                    | 7d             | 31,00 ± 4,00    | 29,00 ± 10,00  |
|                                    | 14 d           | 32,80 ± 2,00    | 28,00 ± 4,00   |

No se encontraron diferencias significativas según análisis de varianza ANOVA-UNO.

Durante la observación de los animales (14 d) no se apreció la aparición de signos tóxicos.

La respuesta al sobresalto, reflejo pineal, corneal, flexorhomolateral y temperatura corporal no mostró diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a las mediciones de actividad y coordinación motora realizadas durante el ensayo, se debe señalar que se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre machos controles y tratados en las mediciones de actividad motora a las 24 h, que coinciden con un decremento de la coordinación motora (medida en el Rota Rod) además de apreciarse, en este caso, incoordinaciones motoras; lo que puede estar relacionado con la inhalación del principio activo retenido en el vendaje durante las primeras 24 h, el cual puede ser el responsable de estos efectos tóxicos si se tiene en cuenta que reacciones similares (inmovilidad, temblores y contracciones musculares) se han reportado con anterioridad para el Oleozón administrado por vía oral en dosis tóxicas.<sup>2</sup>

Por otra parte, la no detección de estos efectos en la hembras puede deberse a que en estas el grosor de la piel es menor, por lo que el Oleozón puede penetrar con mayor facilidad, siendo la concentración de este en la atmósfera menor que en el caso de los machos.

En los animales tratados con aceite de girasol (grupo control) se observó un 50% de presencia de eritema. En este caso, el Índice de Irritación Primario (IIP) fue de 0,3, lo cual lo califica como no irritante;<sup>13</sup> y un 88 % en los tratados con Oleozón para un IIP de 1,1 lo que lo ubica dentro de la categoría de ligeramente irritante.<sup>13</sup> No se detectó edema macroscópico en ninguno de los grupos en estudio mientras que el examen microscópico reveló que el 6,25 % de los animales presentaba edema discreto y el 12,5 % edema perceptible para un total de 18,75 % en el grupo control; en los tratados estos valores fueron de 5,88; 17,64 y 23,52 % respectivamente.

### Estudio anatomopatológico

La comparación de las razones peso de los órganos (bazo, riñón, hígado, ovario o testículos, próstata o útero, timo, corazón, pulmón y cerebro)/peso corporal, no evidenció diferencias significativas entre grupos, tanto en los animales sacrificados a las 24 h como a los 14 d (Tabla II).

**TABLA II**  
**Relación peso de órganos/peso corporal, entre animales controles y tratados durante el tratamiento**

| Organos           | A las 24 h                        |     |        |      | A los 14 d |      |        |     |
|-------------------|-----------------------------------|-----|--------|------|------------|------|--------|-----|
|                   | Hembras                           |     | Machos |      | Hembras    |      | Machos |     |
|                   | CT                                |     | CT     |      | CT         |      | CT     |     |
|                   | Peso de los órganos/peso corporal |     |        |      |            |      |        |     |
| Bazo              | 3028                              |     | 24     | 26   | 31         | 35   | 30     | 26  |
| Riñón             | 74                                | 83  | 76     | 71   | 78         | 84   | 85     | 76  |
| Hígado            | 363                               | 368 | 291    | 343  | 362        | 266  | 395    | 269 |
| Ovario/Testículos | 7                                 | 8   | 129    | 131  | 6          | 18   | 133    | 133 |
| Próstata/Utero    | 25                                | 22  | —      | —    | 19         | 36   | —      | —   |
| Timo              | 25                                | 16  | 25     | 16   | 21         | 22   | 25     | 28  |
| Corazón           | 41                                | 43  | 34     | 3038 |            | 37   | 36     | 29  |
| Pulmón            | 72                                | 76  | 74     | 86   | 68         | 6067 |        | 58  |
| Cerebro           | 64                                | 58  | 52     | 64   | 59         | 58   | 43     | 45  |

Los valores numéricos han sido multiplicados por  $10^{-4}$ . C Control. T Tratados. — Valor perdido.

No se encontraron diferencias significativas en la comparación de la relación peso de órgano/ peso corporal entre controles y tratados.

Durante la necropsia se detectaron las alteraciones siguientes: un animal macho tratado a las 24 h presentó adenomatosis pulmonar; dos animales macho del mismo grupo a las 24 h presentaban bronconeumonía aguda. La adenomatosis pulmonar también se detectó en una rata hembra tratada con Oleozón a los 14 d. El estudio histopatológico reveló que la presencia de estas anomalías no estaban relacionadas con el producto en ensayo.

En la evaluación histopatológica, realizada completamente a ciegas, no se detectaron afecciones renales o hepáticas en ninguno de los animales en estudio.

### Evaluaciones hematológicas

En ninguno de los indicadores medidos se encontraron diferencias significativas entre controles y tratados. Por otra parte, en relación con el comportamiento de las subpoblaciones leucocitarias en animales tratados y controles a las 24 h y los 14 d (Tabla III), a pesar de no haberse encontrado diferen-

cias significativas entre el número total de leucocitos y los porcentajes que representan las subpoblaciones, se apreció en general, a ambos tiempos, una tendencia al incremento del número total de leucocitos y las subpoblaciones de polimorfos, eosinófilos, monocitos y basófilos; lo cual está relacionado probablemente a la ocurrencia de procesos inflamatorios observados, a nivel microscópico, en el sitio de aplicación provocado por mediadores lipídicos proinflamatorios.<sup>14</sup>

Otro elemento que pudiera condicionar la respuesta observada es el que tiene lugar en las capas de la dermis<sup>15</sup> tras la aplicación del Oleozón cuyo principio activo está constituido por lipoperóxidos altamente reactivos capaces de provocar alteraciones en la estructura de la membrana celular.

### Evaluaciones bioquímicas

En los resultados de las valoraciones bioquímicas realizadas (MDA, FLA2, POD, MPO y CAT) a los animales en ensayo en: piel, hígado, riñones y suero; no se observaron variaciones significativas en la actividad de las enzimas y la concentración de MDA en relación con el grupo control por lo que se puede afirmar que los efectos de la aplicación tópica del producto no trascendieron a nivel sistémico.

**TABLA III**  
**Resultados de las evaluaciones hematológicas**

| Indicadores                          | A las 24 h |         |          | A los 14 d |        |        |      |      |
|--------------------------------------|------------|---------|----------|------------|--------|--------|------|------|
|                                      | Hembras    |         | Machos   | Hembras    |        | Machos |      |      |
|                                      | C          | T       | CT       | CT         | CT     |        |      |      |
|                                      | Valores    |         |          |            |        |        |      |      |
| Hemoglobina (g/L)                    | 133,6      | 105,4   | 144,3    | 137,4      | 74,5   | 103,9  | 91,7 | 80,8 |
| Hematocrito (%)                      | 40,0       | 45,0    | 44,3     | 44,3       | 42,3   | 43,3   | 44,7 | 43,6 |
| Glóbulos rojos (10 <sup>12</sup> /L) | 4,0        | 3,9     | 5,7      | 5,9        | 4,03,8 |        | 3,8  | 4,3  |
| Leucocitos (10 <sup>9</sup> /L)      | 3,3        | 3,9     | 4,05,9   |            | 3,3    | 3,9    | 4,7  | 5,9  |
| Linfocitos (%)                       | 93,0       | 80,093, | 5        | 86,093,    | 081,6  |        | 97,3 | 78,0 |
| Polimorfos (%)                       | 4,0        | 6,03,   | 03,04,   |            | 08,4   |        | 1,3  | 5,3  |
| Monocitos (%)                        | 2,0        | 9,3     | 2,08,02, |            | 06,00  |        | ,6   | 12,0 |
| Eosinófilos (%)                      | 1,0        | 3,3     | 1,5      | 1,0        | 1,0    | 3,2    | 0,6  | 3,0  |
| Basófilos (%)                        | 0,0        | 1,3     | 0,0      | 0,0        | 0,0    | 0,8    | 0,0  | 1,0  |

No se encontraron diferencias significativas en la comparación entre controles y tratados según análisis de varianza ANOVA-UNO.  
C Controles. T Tratados.

### CONCLUSIONES

El aceite ozonizado por vía dérmica en ratas no produce letalidad tras la aplicación a dosis única (2 000 mg/kg de peso corporal, basado en el índice de peróxidos).

Salvo alteraciones en la coordinación y actividad motora a las 24 h en los machos tratados, efecto al parecer reversible, pues no se detectó a otros tiempos de observación y el eritema eg rado1y2 en el 88 %d el os animalest ratados con Oleozón a las 24 h no se detectaron otras alteraciones en los indicadores medidos Por otra parte, los resultados bioquímicos permiten afirmar que no tienen lugar eventos tóxicos a nivel sistémico tras la aplicación del Oleozón. El conjunto de resultados demuestra que este medicamento no produce signos tóxicos de consideración a la dosis ensayada por la vía tópica en la especie estudiada.

### AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Silvia Menéndez del Centro de Investigaciones del Ozono por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

### BIBLIOGRAFIA

1. Ping Kwong, Peter Chan and A Wallace Hayes. Principles and Methods of Toxicology. 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, 186, 1989.

2. C. Llerena, G. García, J. Molerio, J. Tillán y S. Menéndez Irritabilidad dérmica del aceite ozonizado (Oleozón), XII Seminario Científico, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 28 al 30 de junio, EXPOCUBA, Ciudad de La Habana, Cuba, 1995.  
3. R. Contreras, Menéndez S., Molerio R. y Eng L. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 20, 122, 1988.  
4. Ecobichon D. The Basis of Toxicity Testing, CRC Press, Florida, USA, 1-50, 1992.  
5. McNamara B.P. New Concepts in Safety Evaluation. Hemisphere Publishing, New York, Chapter 4, 202-240, 1976.  
6. Irwin S. **Psicochopharmacol.** (Berl), 13, 222, 1968.  
7. Hillegas L. M. **Journal of Pharmacol. Methods**, 24, 205, 1990.  
8. Aebi H. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H.U. (Ed.) Chemie, Weinheim, Alemania, Vol. 2, 673, 1974.  
9. ANON Methods of enzymatic analysis Vol. III. Bergmeyer H.U. (Ed.) Chemie, Weinheim, Alemania, 285, 1983.  
10. Boehringer-Mannheim Manual de datos y técnicas de Bioquímica. Alemania, 56, 1994.  
11. Jahanna K. Lang and Carmen Vigo Pestrey Chemistry and Physics of Lipids. 64, 19-29, 1993.  
12. George. W. Snedecor. Every day Statistics. Random numbers. Ed Wm. C. Brown Co., 1950, USA.  
13. McCreesh A. H. and Steinberg M. Skin irritation testing in animals, in Dermatotoxicology. 2nd Ed., Marzulli, F. N. y Maibach, H. I. Eds. Hemisphere Publishing New York, 147-166, 1983.  
14. Samet James M. and Friedman Michell. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 117, 19, 1992.  
15. Casarett and Coull's. Toxicology. The Basis Science of Poisons. Mary O. Amdur; John Doull; Curtis D. Klaassen (Ed.), Pergamon Press, New York, 28, 1991.