

Díaz, Maritza F.;Meneau, Rosa I.;Piña, Yoenia C.;García, Gastón
Evaluación de la irritabilidad vaginal causada por supositorios vaginales formulados a
partir de aceite de teobroma ozonizado
REDVET Revista electrónica de Veterinaria, Vol. 10, Núm. 4, abril-sin mes, 2009, pp. 1-
8
Veterinaria Organización
España

Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63611961018>



REDVET Revista electrónica de Veterinaria
redvet@veterinaria.org
Veterinaria Organización
España

Evaluación de la irritabilidad vaginal causada por supositorios vaginales formulados a partir de aceite de teobroma ozonizado - Evaluation of vaginal irritability caused by formulated vaginal suppositories with ozonized theobroma oil

Díaz Maritza F.¹, Meneau Rosa I.¹, Piña Yoenia C.¹, García Gastón² ¹Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 230 y ave 15, Siboney, Playa, C. de La Habana, Cuba. E-mail: maritza.diaz@cnic.edu.cu ²Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL).

Resumen

El aceite de teobroma ozonizado presenta actividad antifúngica contra la *Candida albicans*. Se realizó un estudio para determinar la posible irritabilidad vaginal de supositorios vaginales OZONOL®, formulados a partir de diferentes porcentajes de aceite de teobroma ozonizado. Los ensayos se realizaron en conejos albinos hembras siguiendo las técnicas descritas en los procedimientos normalizados de trabajo establecidos en el Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas de la Universidad de La Habana. Las formulaciones al 10, 20 y 30 % de aceite de teobroma ozonizado no resultaron irritantes en la vagina de los conejos ensayados mientras que las de 40 y 50 % resultaron mínimamente irritantes. Por estos resultados, puede afirmarse que los supositorios vaginales cumplen con los requisitos indispensables para ser aceptados como medicamento y ser utilizado en el tratamiento de la Candidiasis Vaginal.

Palabras claves: Ozono, *Candida albicans*, aceite de teobroma ozonizado, actividad antimicrobiana, conejo.

Abstract

Antifungicide activity of ozonated theobroma oil against *Candida albicans* has been demonstrated. A study was realized to determine the possible vaginal irritability effect of vaginal suppositories formulated starting from different percents ozonized theobroma oil. The trial was conducted in rabbits 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. Formulation 10, 20 and 30% were not irritating of the mucous one vaginal of the rabbits and the formulations 40 and 50% were minimum irritating. For these results can be affirmed they fulfil the indispensable requirements to be accepted as medications and being used in the treatment of the vaginal Candidiasis.

Keys Words: Ozone, *Candida albicans*, ozonized theobroma oil, antimicrobial activity, rabbits.

Introducción

La *Candida albicans* es una levadura oportunista, máximo responsable de la vulvo-vaginitis micótica¹. En el tratamiento de esta enfermedad se utilizan fundamentalmente los polienos y los derivados del imidazol. Sin embargo el tratamiento a corto plazo ha demostrado un aumento en la resistencia del germen a estos medicamentos². Por lo que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento resulta prioritaria.

Estudios anteriores han demostrado que el aceite de teobroma ozonizado presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra la *Candida albicans*³. Convirtiendo al aceite de teobroma ozonizado en un sustrato ideal para el desarrollo de formulaciones contra enfermedades causadas por dicho microorganismo. Por esta razón, este aceite puede ser utilizado en la fabricación de supositorios vaginales y cremas^{4,5}.

Sin embargo, para su uso en humanos y su posible comercialización se deben cumplimentar una serie de requisitos, entre los que se encuentran los ensayos de irritabilidad vaginal en animales de experimentación, para lo cual la Organización Internacional de Estandarización (ISO) ha descrito el modelo a emplear⁶, lo cual

garantiza que los productos estudiados 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 de diferentes formulaciones de supositorios vaginales a base de aceite de teobroma ozonizado.

Materiales y Métodos

Materiales utilizados

Se utilizó aceite de teobroma virgen, obtenido de la Empresa de derivados del cacao "Rubén David Suárez Abella", Baracoa, Cuba. Los reactivos ácido acético glacial, cloroformo, yoduro de potasio, almidón y tiosulfato de sodio son calidad puro para análisis de la firma MERCK Alemana. Fueron evaluadas mediante ensayo de irritabilidad vaginal, 6 formulaciones de supositorios vaginales con diferentes índices de peróxidos, 5 de ellas a base de aceite de teobroma ozonizado, en una proporción de 10, 20, 30, 40 y 50 %, y una formulación placebo a base de aceite de teobroma virgen, todas ellas elaboradas en el Centro de Investigaciones del Ozono.

Tabla 1. Formulaciones de supositorios vaginales a base de aceite de teobroma ozonizado.

Muestra	Índice de Peróxidos (mmol-eq/ kg)
Aceite de teobroma virgen placebo	0
Aceite de teobroma ozonizado 10 %	103
Aceite de teobroma ozonizado 20 %	249
Aceite de teobroma ozonizado 30 %	344
Aceite de teobroma ozonizado 40 %	441
Aceite de teobroma ozonizado 50 %	536

Determinación del índice de peróxidos (IP)

Se pesaron 0,5 g de muestra y se mezclaron con una disolución de ácido acético glacial-cloroformo 3:2 v/v. Se añadió 0,5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se dejó reposar durante dos minutos, se añadieron 30 mL de agua destilada y se valoró lentamente con una disolución de tiosulfato de sodio 0,1 M,

agitando de forma continua hasta la casi desaparición del color amarillo. Se añadió 5 mL de una disolución indicadora de almidón y se continuó la valoración hasta la desaparición del color azul.

El IP fue calculado de la expresión:

$$IP = 100 \ v / m$$

donde: v es el volumen en mL y m es la masa en g de la muestra pesada. El IP se expresa en mmol-equivalente de oxígeno activo por kg de muestra⁷. Los valores se calcularon por triplicados media \pm desviación estándar.

Selección de los animales

Se emplearon conejos albinos híbridos F1 hembras vírgenes con peso corporal menor de 2 kg procedentes del Centro Productor de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con sus correspondientes certificados de salud. Los animales fueron mantenidos en cuarentena y aclimatación, con acceso a agua y comida *ad libitum*, con un ciclo luz/oscuridad 12 x 12 horas, temperatura 22 ± 1 °C y humedad 50 ± 5 %.

Los animales fueron divididos en siete grupos de 3 animales cada uno, estructurados de la forma siguiente:

- Grupo I: Control
- Grupo II: Tratado con supositorio vaginal placebo a base de aceite de teobroma virgen
- Grupo III: Tratado con supositorio vaginal formulado con un 10% de aceite de teobroma ozonizado
- Grupo IV: Tratado con supositorio vaginal formulado con un 20% de aceite de teobroma ozonizado
- Grupo V: Tratado con supositorio vaginal formulado con un 30% de aceite de teobroma ozonizado
- Grupo VI: Tratado con supositorio vaginal formulado con un 40% de aceite de teobroma ozonizado
- Grupo VII: Tratado con supositorio vaginal formulado con un 50% de aceite de teobroma ozonizado

Irritabilidad vaginal

Fue evaluado un ensayo de irritabilidad vaginal, según el modelo descrito por la guía ISO⁶, el cual permite obtener la evaluación de los grupos tratados y control, para determinar si la sustancia a evaluar tiene potencialidad de producir efectos dañinos sobre la mucosa vaginal. Para ello se utilizaron las técnicas descritas en los

procedimientos establecidos en el Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos (CEIEB-IFAL)⁸⁻¹⁰.

Se define como Índice de Irritación Individual como el que se obtiene al sacar los cálculos que corresponden a las evaluaciones histopatológicas según la tabla B 4 Sistema de Graduación para el Examen Microscópico de la ISO⁶, para cada grupo Tratado, Placebo y Control.

El Índice de irritabilidad vaginal comparado nos permite obtener la evolución de los grupos tratados y placebo respecto al grupo control, según lo reportado en la tabla B.5 Índice de Irritación que aparece en la ISO⁶. Este índice corresponde a la diferencia entre el valor obtenido del índice de irritación individual del grupo tratado con supositorio vaginal formulado y el índice de irritación individual del grupo control ó la diferencia entre el valor obtenido entre el índice de irritación individual del grupo tratado con supositorio vaginal placebo y el índice de irritación individual del grupo control.

Los conejos recibieron un tratamiento de 1 supositorio vaginal diario durante 5 días. Se colocaron los animales en cajas de retención de manera que permitieran el acceso al perineo. Momentos antes de introducir el supositorio se aplicó en la vagina un lubricante inerte, de manera que facilitara la inserción, se elevó la parte posterior del conejo, exponiéndose el perineo e insertándose suavemente el supositorio vaginal. Se realizó una observación clínica diaria, de la apariencia física de la vagina y el perineo para signos de descarga, eritema e irritación¹¹ antes de la aplicación del tratamiento así como previo al sacrificio. El sacrificio se fijó a los 6 días de iniciado el tratamiento si no se presentaban daños severos o alarmantes. Al día siguiente del último tratamiento los animales fueron sacrificados mediante inyección letal, con pentobarbital sódico (60 mg/kg) en la vena marginal de la oreja.

Observaciones microscópicas

La vagina de cada animal fue diseccionada, abierta longitudinalmente y examinada para signos de irritación, daños al tejido o necrosis tisular, comparando los efectos irritantes sobre el tejido vaginal de los animales tratados con el tejido de los animales control.

Evaluación histológica

Las vaginas diseccionadas se fijaron en formol al 10 % durante una semana. Al concluir este período, 3 secciones de cada vagina fueron embebidas en parafina y teñidas con hematoxilina eosina para el

examen histopatológico. La evaluación efectuada se basa en la tabla descrita por la ISO para este tipo de trabajo ⁶

Tabla 2. Sistema de clasificación microscópica atendiendo al tipo de alteración histopatológica en el tejido vaginal.

Tipo de reacción				Escala de Puntos
Epitelio	Congestión vascular	Infiltración Leucocitaria	Edema	
Normal intacto	Ausente	Ausente	Ausente	0
Degeneración celular	Mínima	Mínima (<25)	Mínima	1
Metaplasia	Media	Media (26-50)	Media	2
Erosión focal	Moderada	Moderada(51-100)	Moderada	3
Erosión generalizada	Marcada con ruptura de vasos	Marcada (>100)	Severa	4

Según la severidad del tipo de reacción, se le asignó una puntuación a cada parte del órgano evaluada y se calculó el promedio dado en la escala de puntos. Al valor obtenido en cada grupo se le restó el obtenido para el grupo control. El dato obtenido se considera el índice de irritación vaginal para cada grupo. La relación entre el índice de irritabilidad y la categoría de respuesta se expresan en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de la irritabilidad atendiendo al valor del índice de irritabilidad calculado ¹¹.

Índice de irritación	Categoría de respuesta
0	Nula
1-4	Mínima
5-8	Media
9-11	Moderada
12-16	Severa

Resultados y Discusión

Durante las observaciones clínicas realizadas, no se aprecian lesiones que muestren signos de irritación en los animales tratados.

Desde el punto de vista microscópico solo se apreciaron en los animales sometidos al estudio ligeras lesiones eritematosas. Ello puede estar relacionado con una respuesta fisiológica producto de la activación de los mecanismos de defensa uterinos como respuesta a la aplicación del supositorio vaginal.

El grado de irritabilidad que presentaron los animales para los grupos tratados con supositorios vaginales de teobroma ozonizado al 10, 20 y 30 % fue nulo, mientras que para 40 y 50 % fue discreto (tabla 4).

Tabla 4. Índice de irritabilidad vaginal en los grupos estudiados.

Grupo	Individual	Comparado	Categoría de respuesta
I Control	1,3	-	
II Placebo	1,3	0	nula
III Tratado 10%	1,3	0	nula
IV Tratado 20%	1,4	0,1	nula
V Tratado 30%	1,6	0,3	nula
VI Tratado 40%	3,2	1,9	mínima
VII Tratado 50%	3,4	2,1	mínima

El índice de irritabilidad obtenido en cada grupo de tratamiento y la categoría de la respuesta al ensayo varía entre nula y mínima, por lo que podemos concluir que el producto no produce efectos irritantes sobre el órgano evaluado y puede ser aplicado por vía intravaginal.

Conclusiones

1. Solo se observaron ligeras lesiones eritematosas desde el punto de vista microscópico.
2. No se observaron signos clínicos en los animales sometidos al estudio.
3. Los supositorios vaginales de teobroma ozonizado al 10, 20 y 30 % son no irritantes, mientras que al 40 y 50 % se clasifican como minimamente irritante, considerándolos potencialmente no irritante para el hombre.

Referencias Bibliográficas

1. Jawetz, E., Melnick, I., Adelberg E. *Manual de Microbiología Médica*. Editorial Pueblo y Educación: Instituto Cubano del Libro, 1968, pp. 235-278.
2. Bemrick W. Some perspectives on the transmission of giardiasis, in Erlandsen SL, Meyer EA (eds). *Giardia and Giardiasis. Biology*,

- Pathogenesis, and Epidemiology*. Plenum Press. New York City, 1984, pp. 379-397.
3. Fernández, I., Curtiellas, P., Sánchez, E., Gómez, M. In vitro antimicrobial activity of ozonized theobroma oil against *Candida albicans*. *Ozone Sci. Eng.* 2006, vol. 28 nº 3, p. 187-190.
 4. Díaz, M., Fernández, H., Gómez, M., Meneau, R. I., García, K., Sánchez, Y., Dennis, P., Piña, Y., Manet, B., García, L., Dayana, Gil. Renovación de la materia prima ozonizada para cosmético. Marca OZONOL. 2007, nº 2R-069/04 XII.
 5. Díaz, M., Fernández, H., Gómez, M., Meneau, R. I., García, K., Sánchez, Y., Dennis, P., Piña, Y., Manet, B., García, L. Renovación del registro sanitario Crema Revitalizadora Ozonizada OZONOL 2006, nº R-097/03 XXIV.
 6. ISO 10993 Biological evaluation of medical devices. Part 10: Vaginal Test. European Committee for Standardization. 2002.
 7. British Pharmacopeia. 2000 Appendix XF, IA, IB. Peroxide value.
 8. PNT/ANI/005 Procedimiento Normalizado de Trabajo. Alimentación de rutina. Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos.
 9. PNT/ANI/006 Procedimiento Normalizado de Trabajo. Suministro de agua manual de rutina. Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos.
 10. PNT/ANI/011 Procedimiento Normalizado de Trabajo. Cuarentena. Centro de Estudio para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos.
 11. Draize, J.H. Methods to the study of the irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and membranes. *J. Pharm.* 2004, vol. 2 nº 3, p. 8-12.

REDVET: 2009 Vol. 10, Nº 4

Recibido 19.09.08 - Ref. prov. T006 - 05.01.09 - Aceptado 06.03.09
Ref. def. 040428REDVET Publicado: 14.04.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409/040901.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org>
y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>