

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Estudio toxicológico de irritabilidad dérmica y oftálmica de Microorganismos Eficientes (VersaKlin®).

Reynaldo Oliva Hernández¹, Mildrey Fariñas Medina¹, Darcy Núñez Martínez¹, Gastón García Simón², Quintero Pérez¹, Mariela Naranjo Medina¹, Adriana Callico¹, Gustavo Bracho Granado¹, Concepción Campa Huergo¹.

e-mail: roh@finlay.edu.cu; reyolivacuba@gmail.com

- 1- Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de vacunas. Ave.27 No. 19805, municipio La Lisa, La Habana, Cuba.
- 2- Lic. Ciencias Biológicas. Profesor Consultante. Instituto de Farmacia y Alimentos. IFAL. UH.

Resumen

Se realizó un estudio toxicológico para determinar la posible irritabilidad dérmica y oftálmica de Microorganismos Eficientes (ME) (VersaKlin®). El ensayo se llevó a cabo en conejos F1 procedentes del CENPALAB, con un peso entre 2 y 2.2 kg de sexo hembras, aplicando las técnicas descritas según los PNO para dichas pruebas, se aplicó el producto sobre piel, ojos y conjuntivas de los mismos. El estudio tuvo una duración de 7 días durante el cual fueron observados los animales diariamente. El producto en prueba resultó No Irritante dérmico y oftálmico, por lo que se concluyó desde el punto vista toxicológico como potencialmente no irritante al pasar satisfactoriamente la prueba.

Palabras Claves: Microorganismos Eficientes, Toxicidad ensayo / métodos, irritabilidad, dérmica, oftálmicas, conejos.

Abstract

Toxicological study of dermal and eye irritability Efficient Microorganisms (VersaKlin®)

A toxicological study was performed to determine the potential dermal and eye irritability Efficient Microorganisms (EM) (VersaKlin®). The trial was conducted in rabbits of F1 line from the CENPALAB, weighing between 2 and 2.2 kg female sex, applying the techniques described by the SPO for such tests, the product on skin, eyes and conjunctiva of the same was applied. The study lasted for seven days during which the animals were observed daily. The test product resulted not dermal and eye irritant, so it was concluded from the toxicological point as potentially not irritating to successfully pass the test.

Keys words: Efficient Microorganisms, Toxicity test/methods, cutaneous, ophthalmic, Irritants, Rabbits.

Introducción

Los Microorganismos Eficientes (ME) son una combinación de microorganismos beneficiosos de origen natural. Contiene principalmente microorganismos de cuatro géneros principales: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos, así como metabolitos derivados de la fermentación. Estos han sido ampliamente usados en diferentes propósitos, en la agricultura, donde han demostrado mejorar la calidad de los suelos, la optimización de los cultivos y cosechas, en la utilización eficiente y el reciclado de la energía de la plantas, así como en la preservación del medio Ambiente y de los Recursos Naturales. También es conocido el uso de los ME como probiótico y para el tratamiento de desechos con el objeto de mejorar la producción, controlar olores y procesar los residuos en granjas porcinas y de ganado vacuno. La tecnología ME fue originalmente desarrollada en Okinawa, Japón en el año 1980 por el Doctor Teruo Higa, y desde entonces está siendo utilizada en más de 80 países diferentes ⁽¹⁾. Se reportan también otros usos, como antioxidantes en preparaciones similares donde además de otros productos naturales como el de arroz sin pulir fermentado, algas marinas y ME, demostró en estudios realizados en ratas efectos neuroprotectores potenciales ⁽²⁾. La utilización de los ME encierra grandes posibilidades para los productores de cerdos y ganado vacuno. Es sumamente económica, fácil de aplicar, y produce buenos resultados en el control de olores, como probiótico y en las áreas de manejo de desechos, sanitación y producción de abonos orgánicos a partir de desechos animales ⁽¹⁾. Por lo que al tener el Instituto Finlay la capacidad de producir este producto natural para la venta nacional a diferentes sectores de la economía del país, como la agronomía, veterinaria, salud pública, entre otros, se evaluó a través del estudio toxicológico de irritabilidad dérmica y oftálmica al producto ME (VersaKlin®), para demostrar posibles efectos tóxicos.

Materiales y métodos

Proceso tecnológico para la obtención de los microorganismos eficientes. Breve descripción.

El proceso productivo para la obtención de los ME se basa en dos fermentaciones líquidas:

La primera, a partir de una fermentación en estado sólido de microorganismos beneficiosos (madre sólida) que dan lugar al inóculo de la segunda etapa. Estos microorganismos son: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos que al entrar en contacto con la materia orgánica secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales y fundamentalmente sustancias antioxidantes.

La madre sólida, como materia prima, es sometida a controles de calidad para ser liberada para su uso. Se chequean las propiedades organolépticas (color marrón amarillento y olor avinado dulce); valor de pH menor que 4; concentración ácido láctico/ácido acético, % de humedad, microorganismos presentes y límite microbiano (ausencia de microorganismos patógenos).

Estas fermentaciones anaerobias tienen una duración de 3 a 7 días cada una. El medio de cultivo es una mezcla de disolución de Melaza y disolución de Suero de Leche. El proceso se desarrolla entre 30-35 °C siendo la temperatura óptima para el desarrollo de estos microorganismos de 35°C. Durante el proceso se chequea la caída libre del pH del cultivo, parámetro que determina el final de las fermentaciones ($3.5 < \text{pH} < 3.8$).

El equipamiento utilizado garantiza la calidad del cultivo y optimiza el proceso fermentativo. Para la mejor disolución de la madre sólida se utilizan agitadores magnéticos. El medio se prepara en tanques de 500 L, instrumentados con accesorios que permiten medir la temperatura, homogeneizar las disoluciones, presurizar los tanques para facilitar la transferencia del medio hacia el resto de los equipos. El Suero de Leche se conserva en cámara fría a una temperatura aproximada de 12 °C. La primera fermentación se realiza en un fermentador de 300 L de acero inoxidable garantizando

que se mantenga todo el tiempo la temperatura de trabajo y las condiciones anaerobias; permite también la agitación para la homogenización del cultivo para la toma de muestras y cuenta con sensor de pH. La segunda fermentación se realiza en tanques plásticos de 2000L diseñados para el envase *in situ* del producto. Este se guarda en frascos y tanques plásticos de diferentes volúmenes (1, 4, 5 y 20 L) en el área de almacenamiento de producto terminado luego de la identificación o etiquetado del lote. El tamaño de cada lote y la distribución en los envases dependen de la demanda del producto.

El producto final se somete a ensayos de calidad para su liberación por la Dirección de Control de Calidad. Se chequean las propiedades organolépticas (color marrón amarillento y olor avinado dulce); valor de pH 3–4, conteo total de microorganismos, límite microbiano (ausencia de microorganismos patógenos) y determinación de la concentración de ácido láctico/ácido acético.

Producto

Microorganismos Eficiente (ME) Lote: ME13001-E

Fecha de Fabricación: 28/2/2013

Composición Cualitativa

Los Microorganismos Eficientes son una combinación de microorganismos beneficiosos de origen natural. Contiene principalmente microorganismos de cuatro géneros principales: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos, así como metabolitos derivados de la fermentación

Propiedades Físico-Químicas

Color: Marrón amarillento

Olor: avinado dulce

pH: ≤ 4

Presentación

Frazcos plásticos de 1, 4, 5 y 20 litros.

Animales:

Se utilizaron conejos de la línea F1 con un peso entre 2 y 2.2 kg procedente del CENPALAB con su correspondiente certificado de calidad sanitaria y genética, de sexo hembras. Los animales fueron mantenidos en condiciones convencionales, con régimen de luz 12 x 12 h, agua y comida "ad limitum", temperatura y humedad controlada.

Ensayo de irritabilidad dérmica: La prueba de irritabilidad dérmica se realizó en 4 conejos siguiendo lo descrito por el PNT/ANI/0207 establecidos por el CIEB-IFAL. Para esta prueba se empleó el producto puro, el cual se aplicó en un área aproximada de 6 cm², previa depilación de 24 horas (**ver figura No.1**). El cálculo de índice de irritabilidad dérmica (IID) se efectuó sumando todas las observaciones de 24, 48 y 72 h, dividiéndola por el número de observaciones realizadas. El valor obtenido se comparó con lo reportado en el PNT correspondiente para clasificar el producto y de esta forma su aprobación o rechazo según las normas de la OECD ⁽³⁾.

Ensayo de irritabilidad oftálmica: Esta prueba se realizó igualmente en 4 conejos, siguiendo lo descrito por el PNT/ANI/0208 establecidos por el CIEB-IFAL. El producto fue aplicado 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 como control (**ver figura No.2**). Para graduar las afectaciones que presentaron y evaluar los resultados se utilizó el PNT correspondiente. El cálculo del índice de irritabilidad oftálmica (IIO) se determinó mediante la suma de todas las observaciones que se encontraron en las 3 estructuras analizadas (Cornea, iris y conjuntiva), en los tiempos que se prefijan y este valor se dividió por 12, el resultado obtenido será el IIO, según OECD y García ^(4, 5).

Resultados y discusión

Ensayo de irritabilidad dérmica: El día del ensayo y durante los 3 días posteriores se efectuaron lecturas de la piel para eritema, edema y escaras, sin observar en ninguno de los animales lesiones de esta índole. Tampoco se observaron síntomas clínicos en los animales sometidos a prueba, por lo que el índice de irritación dérmica para ME es 0,0, lo cual cataloga a la sustancia como potencialmente no irritante para la piel, según la escala establecida en la literatura (5, 6). Estudios similares al nuestro realizado por otros autores evidencia la utilidad de este (7, 8) y se cumple con las directrices de la OECD (3,4), (**ver figura No. 3- 5**)

Ensayo de irritabilidad oftálmica: Durante todas las observaciones después de aplicado el producto solo se registro en uno de los animales tratados lesiones en la cornea que clasifíco como pequeña área dispersas o difusas detalles del iris claramente visible calificación valor 1 (de escala de 1-4) y calificando en valor 1 igualmente al ocupar de $0 < x \leq \frac{1}{4}$ segunda escala de Draize (6) y metodología propuesta por García (5) la cual se observo transcurrida una hora posterior a la aplicación del producto y que desapareció a las 48 horas, no hubo daño del iris, ni señales de enrojecimiento anormal de las conjuntivas, ni edemas, no hubo descargas o secreciones, tampoco se observaron síntomas clínicos de otra índole en los animales sometidos a prueba (**ver figura No.6**), al realizar los cálculos correspondiente de las diferentes observaciones de los 4 animales de este estudio el IIO de este fue 0,0, por lo que este producto es potencialmente no irritante para la estructura ocular. Otros productos evaluados por otros autores han clasificados como moderadamente irritantes o ligeramente irritantes cuando el IIO a estado en un rango de $20 \leq x < 30$ ó $10 \leq x < 20$ respectivamente (5, 7-8).

Estudios de toxicidad aguda y seguridad a producto similar al evaluado ha sido sometido por otros autores en diferentes modelos animales administrado por vial oral demostrándose, no toxicidad de estos (5). Igualmente estas pruebas de irritabilidad

además son las más comúnmente utilizadas para demostrar la posible inocuidad de diferentes fármacos tanto químicos como naturales ⁽³⁾.

Conclusiones

Sobre la base de los resultados obtenidos se concluye que el producto evaluado es potencialmente no irritante.



Figura No.1: Animal tratado. Parche que cubre aplicación del producto en un área aproximadamente de 6 cm² por 4 horas.



Figura No. 2: Animal tratado. Aplicación del producto en saco ocular del ojo derecho.



Figura No.3: Animal tratado. Obsérvese área de aplicación de producto sin ningún tipo de lesión dérmica pasadas 4 horas.



Figura No.4: Animal tratado. Obsérvese área de aplicación de producto sin ningún tipo de lesión dérmica pasadas 24 horas.



Figura No.5: Animal tratado. Obsérvese área de aplicación de producto sin ningún tipo de lesión dérmica pasadas 48 horas.

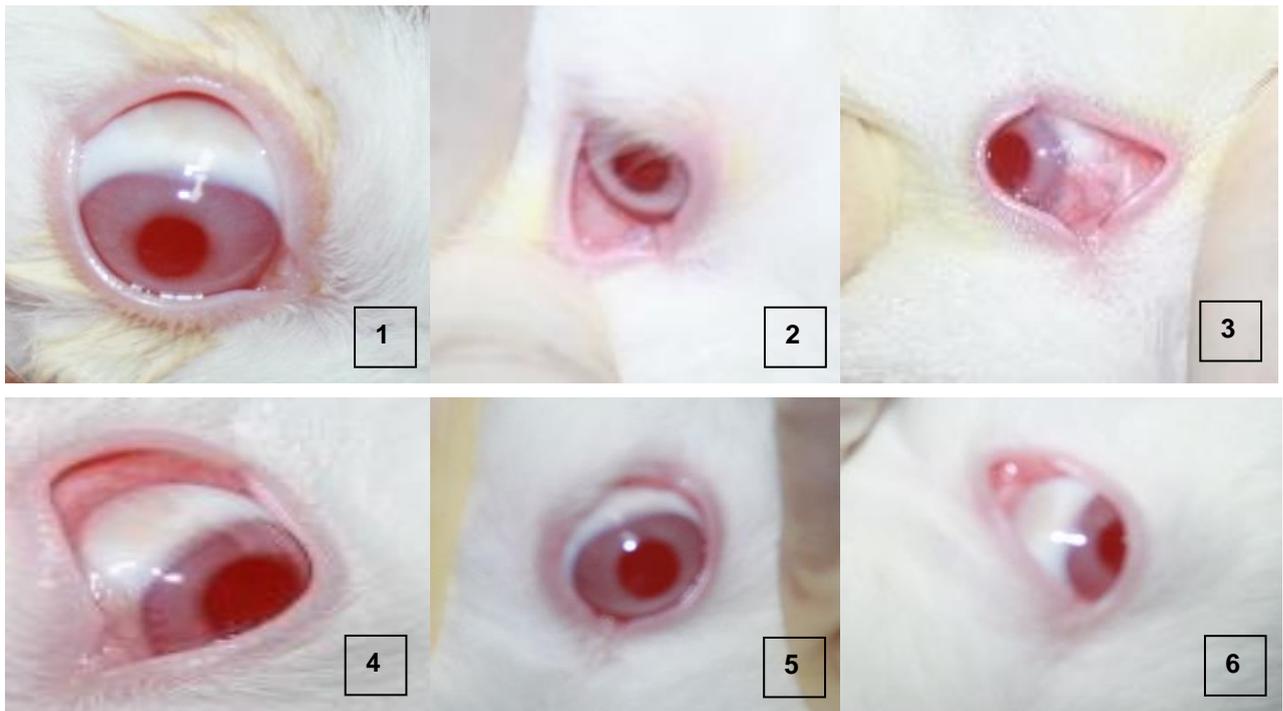


Figura No. 6: Animal tratado una hora de aplicado el producto. 1, 2 y 3 ojo derecho tratado con el producto, 4, 5 y 6 ojo izquierdo no tratado. Obsérvese que no hay signos de irritabilidad oftálmica en ninguna de las estructuras de los ojos, conjuntivas y mucosas de coloración normal.

Referencias bibliográficas

- 1- Teruo Higa y James F. Parr. Microorganismos beneficiosos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenibles. http://www.fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf. Consultado Abril 2013 .
- 2- Datla, K.P., Bennett, R.D., Zbarsky, V., Ke, B., Liang, Y.-F., Higa, T., Bahorun, T., Aruoma, O.I., Dexter, D.T. The antioxidant cocktail "effective microorganism-X (EM-X)" pre-treatment protects nigrostriatal dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine-lesion rat model of Parkinson's disease. *J. Pharma. Pharmacol* , 56, 2004, 649-654.
- 3- Gastón García Simón, Miriam Palacios Alvarez, Liliana Pérez Puerta, Ramón García Alea, Grisela Díaz Machado y Raúl Gazapo Pernas. Elaboración de una metodología para evaluar la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol.2 No.2 1998: 5-24.
- 4- Isis Bermúdez Camps, Gastón García Simón, Eliécer Martínez Suárez y Keyla Díaz Hernández. Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante de la crema ulceprol. *Anuario Toxicología* 2001; 1 (1) 93-7.
- 5- Bin Ke, Yun-Fei Liang, Zheng-Xian Zhong, Terou Higa, Okezie I. Aruoma, Evaluation of the toxicity and safety of the antioxidant beverage effective microorganisms-X (EM-X) in animal models. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20 (2005) 313-320.
- 6- OECD (2004), Acute dermal irritation/corrosion. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: <http://www.oecd.org/env/testguidelines> Consultado 5/4/2013. Consulta: Abril 2013.
- 7- OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposal for an Updated TG 405, Acute Eye Irritation/Corrosion. 2012. Available at:

<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/OECD/OECD-TG405-2012-508.pdf>.

[Consultado 5/4/2013](#). Consulta: Abril 2013.

8- Draize J. et al. J Pharmac and Exp. Ther. 1994; 4(82): 377.

Recibido: 26/08/14

Aceptado: 04/09/14