

Trabajo Original

Toxicología Experimental

## **Evaluación de la toxicidad aguda oral y de sensibilización cutánea de Microorganismos Eficientes.**

**Ailemys Curbelo<sup>1</sup>, Teresa Figueroa<sup>2</sup>, Eric Acosta<sup>1</sup>, Marivy Gutiérrez<sup>1</sup>, Consuelo González<sup>1</sup>, Yesenia Rivero<sup>1</sup>, Yana González<sup>1</sup>, Axel Mancebo<sup>1</sup>, Fe Fernández<sup>1</sup>, Axel Valdivia<sup>1</sup>, Odys N Hernández<sup>3</sup>.**

1. Centro de Toxicología Experimental (CETEX), Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Calle 3ra N° 40759 entre 6ta y Carretera Tirabeque, Reparto La Unión, Boyeros. Telf.: 7683 7225, e-mail: [ailemys.curbelo@cenpalab.cu](mailto:ailemys.curbelo@cenpalab.cu)
2. Dirección de Biotecnología, CENPALAB.
3. Departamento de Producción de Microorganismos Eficientes, CENPALAB.

---

## Resumen

Los Microorganismos Eficientes (ME) son una combinación de microorganismos beneficiosos de origen natural que han sido ampliamente usados en la agricultura, en la preservación del medio ambiente y de los recursos naturales, como probióticos y para el tratamiento de desechos sólidos y líquidos, con el objetivo de mejorar la producción, controlar olores y procesar los residuos en granjas porcinas y de ganado vacuno. El CENPALAB ha desarrollado la capacidad de obtener este producto natural, por lo que fue necesario para su registro, la realización de estudios toxicológicos. Se realizó la evaluación de la toxicidad aguda por vía oral en ratas hembras Cenp: SPRD y la prueba de sensibilización de la piel en curieles Cenp: HARTLEY de ambos sexos. Los estudios contaron con un grupo Control y un grupo Tratado con ME (ME-AgroAmbiental). Las ratas se observaron individualmente durante 14 días y se determinó el peso corporal con una frecuencia semanal. Los curieles recibieron 3 aplicaciones de inducción separadas entre sí por 7 días y una aplicación de desafío a los 14 días. Todas las aplicaciones se realizaron mediante parches durante 6 horas. A las 24 y 48 horas de la remoción de los parches, se realizó la observación del sitio para determinar si ocurrían o no reacciones. Fueron pesados todos los curieles semanalmente. Ambos estudios concluyeron con una supervivencia del 100%, sin detectarse signos de toxicidad, ni reacción cutánea (en curieles). La administración a dosis única por vía oral de los ME no produjo toxicidad en las ratas Cenp: SPRD y además puede considerarse la sustancia como no sensibilizante.

**Palabras Claves:** Microorganismos Eficientes, ME-AgroAmbiental, Toxicidad Aguda oral, Ensayo de Sensibilización, Rata, Curiel.

**Abstract**

**Evaluation of acute oral toxicity and skin sensitization of Efficient Microorganisms**

Efficient Microorganisms (EM) are a combination of beneficial microorganisms of natural origin that have been widely used in agriculture, in the preservation of the environment and natural resources, as probiotics and for the treatment of solid and liquid waste, with the aim of improving the production, controlling odors and processing waste in pig and cattle farms. CENPALAB has developed the capacity to obtain this natural product, so it was necessary for its registration, to carry out toxicological studies. The evaluation of acute oral toxicity was performed in female Cenf rats:SPRD and the skin sensitization test in Cenf:HARTLEY guinea pig of both sexes. The studies had a Control group and a treated group with EM (EM-AgroAmbiental). The rats were observed individually for 14 days and the body weight was determined with a weekly frequency. The guinea pig received 3 separate induction applications for 7 days and a challenge application after 14 days. All applications were made by patching for 6 hours. At 24 and 48 hours after the removal of the patches, the observation of the site was made to determine whether or not reactions occurred. All the guinea pigs were weighed weekly. Both studies concluded with a 100% survival, without detecting signs of toxicity or skin reaction (in guinea pig). Single-dose oral administration of EMs did not produce toxicity in Cenf:SPRD rats and the substance can also be considered as non-sensitizing.

**Keys words:** Efficient Microorganisms, Acute oral toxicity, Sensitization test, Rat, Guinea pig

## Introducción

Los Microorganismos Eficientes (ME) son una combinación de microorganismos beneficiosos de origen natural. Su concepto y tecnología fue desarrollado por el Doctor Teruo Higa en la Universidad de Ryukyus, Okinawa, Japón. Estudiando las funciones individuales de diferentes microorganismos, encontró que el éxito de su efecto potencializador estaba en su mezcla. Desde entonces, esta tecnología ha sido investigada, desarrollada y aplicada a una multitud de usos agropecuarios y ambientales, siendo utilizado en más de 80 países diferentes<sup>1</sup>. Los ME contienen 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 las plantas, así como en la preservación del medio ambiente y de los recursos naturales. También es conocido el uso de los ME como probióticos y para el tratamiento de desechos sólidos y líquidos de origen industrial o no, con el objeto de mejorar la producción, controlar olores y procesar los residuos en granjas porcinas y de ganado vacuno<sup>2</sup>.

El CENPALAB ha desarrollado la capacidad de obtener este producto natural, con nombre comercial ME-AgroAmbiental, por lo que resulta necesario para su registro la realización de estudios toxicológicos. Entre ellos se realizó el ensayo de Toxicidad Aguda Oral, teniendo en cuenta la guía OPPTS 870.1100 "*Acute Oral Toxicity*" de la EPA (*Environmental Protection Agency*)<sup>3</sup> y la TG 420 "*Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*" de la OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*)<sup>4</sup>. También fue determinado el potencial de causar o producir reacciones de sensibilización de la piel (dermatitis alérgica de contacto). Este ensayo se realizó tomando como base el protocolo OPPTS 870.2600 "*Skin Sensitization*" de la EPA<sup>5</sup> y el de la ISO 10993-10:2002, "*Test for Irritation and Delayed Hypersensitivity Sensitization*"<sup>6</sup>. El tipo de ensayo

realizado siguió el Método de Buehler. Fueron cumplidos los POT<sup>7</sup> establecidos en el CETEX para la realización de estudios toxicológicos, así como los Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004<sup>8</sup>, la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales de Laboratorio del CENPALAB<sup>9</sup> y las consideraciones del Manual de Bioseguridad del CETEX<sup>10</sup>.

## **Materiales y Métodos**

Los ensayos se realizaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB.

La sustancia de ensayo, Microorganismos Eficientes (ME-AgroAmbiental), fue suministrada por la Dirección de Biotecnología del CENPALAB<sup>11</sup>. La misma fue negativa a microorganismos patógenos como *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureas*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Coliformes fecales y totales*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*.

Ensayo de Toxicidad Aguda Oral en ratas Cenp:SPRD

Se utilizaron 12 ratas hembras Cenp:SPRD con un rango de peso aproximado de 170-185 g, procedentes de la Dirección de Animales Gnotobióticos del CENPALAB. Fueron distribuidas al azar para formar 2 grupos experimentales (6 hembras cada uno), empleando el programa de números aleatorios LABTOOLS<sup>12</sup>. Los animales se alojaron en grupos de 3 animales en cajas T4 autoclaveables TECNIPLAST plásticas (Policarbonato), traslúcidas, con fondo y tapa de rejilla intercambiables. El alimento peletizado, fórmula EAO 1004 (ALYco, CENPALAB) se ofreció autoclaveado, al igual que el agua, suministrada en biberones plásticos traslúcidos de 500 ml con pipetas de acero inoxidable.

El lote de ME-AgroAmbiental utilizado fue 16003 ME (Experimental) y como sustancia control se empleo Agua estéril. Ambas sustancias fueron administradas por vía oral (cánula metálica) con previo ayuno nocturno. Se realizó una única administración de aproximadamente 2 ml para animales de 200 g, lo que representa en término de

microorganismos viables,  $10^5$  UFC de bacterias aerobias y  $10^4$  UFC de hongos y levaduras totales/animal.

El estudio tuvo una duración de 14 días, realizando observaciones clínica individuales diarias y determinando el peso corporal individual semanalmente, en una Balanza KERN PFb 1200 g. La eutanasia se efectuó mediante sedación con éter dietílico, seguida de exsanguinación y dislocación cervical, realizando necropsia completa a todos los animales.

Ensayo de Sensibilización cutánea en curieles Cenp:HARTLEY

Fueron utilizados 30 curieles (15 de cada sexo) de la línea Cenp:HARTLEY, con un rango de peso entre 370 –425 g. Los mismos procedían de la Colonia de Curieles de la Dirección de Animales Gnotobióticos del CENPALAB. Se alojaron de forma individual en jaulas de acero inoxidable INPUD con bandejas para la recolección de los desechos. El alimento peletizado y esterilizable, fórmula EMO:1301 (ALYco®, CENPALAB) se ofreció a libertad al igual que el agua autoclaveada, que se suministró mediante un sistema de tetinas. Se formaron dos grupos experimentales:

- Grupo Control (Solución Salina Fisiológica, lote 1302002, LABIOFAM): 5 hembras y 5 machos
- Grupo Tratado (Microorganismos Eficientes (ME-AgroAmbiental), lote 16007 ME): 10 hembras y 10 machos

Aproximadamente 24 horas antes de cada aplicación, fue removido el pelo del área dorsal del lomo de cada animal mediante rasurado. En ambos grupos, se realizaron tres aplicaciones de inducción (día 0, 7 y 14 del estudio, en el lado derecho del lomo) y una de desafío el día 28 del estudio (en el lado izquierdo del lomo). En todos los casos se aplicó un volumen de 0.5 mL, mediante un parche de gasa de 4- 6 cm<sup>2</sup> que se mantuvo en contacto con la piel durante 6 horas. En el desafío, a ambos grupos se les aplicó el parche con ME-AgroAmbiental. La concentración de ME utilizada en todos los casos fue la misma ( $10^4$ UFC/mL).

Se realizó la observación clínica individual diaria, y a las 6 horas posteriores de cada aplicación de las sustancias (remoción del parche), se realizó la observación de la zona

aplicada. A las 24 y 48 horas posteriores a la remoción del parche se realizó la lectura para determinar si habían ocurrido o no reacciones dérmicas de irritación. Para la interpretación de los resultados y clasificación de la sustancia evaluada, se utilizó como referencia el siguiente sistema de evaluación:

<b>% de animales sensibilizados</b>	<b>Grado</b>	<b>Clasificación</b>
0 - 8	I	Débil
8 - 28	II	Medio
29 - 64	III	Moderado
65 - 90	IV	Fuerte
91 - 100	V	Extremo

El peso corporal se determinó individualmente a todos los animales, previo a la primera aplicación del vehículo y la sustancia de ensayo (día -1), y posteriormente con frecuencia semanal. La eutanasia se efectuó mediante contusión y exsanguinación.

#### Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico PASW Statistics 18 versión 18.0.0<sup>13</sup>, utilizando la prueba T para muestras independientes en la comparación de ambos grupos experimentales. Las diferencias entre días se analizaron mediante un ANOVA de una vía, incluyendo una prueba DMS para determinar entre que grupos eran las diferencias. Se trabajó para un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

Ambos ensayos concluyeron con una supervivencia del 100 %. No se produjeron signos clínicos de interés. Los curieles no mostraron ninguna alteración en la zona de aplicación. El comportamiento del peso corporal en las ratas Cenp:SPRD se muestra en la figura 1 y el de los curieles Cenp:HARTLEY en las figuras 2 y 3. En todos los casos se obtuvo aumento del peso corporal del inicio al final de cada estudio. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos en ningún día de los estudios.

El peso corporal es uno de los parámetros que nos brinda mayor información acerca de la toxicidad de una sustancia; la pérdida significativa de peso corporal puede ser uno de los indicadores más sensibles del deterioro animal y ser interpretada en la mayoría de los

casos como un signo inequívoco de toxicidad<sup>14</sup>. Sin embargo, en estos ensayos al analizar el comportamiento de esta variable entre los diferentes días de los estudios, para cada grupo y sexo (ANOVA) se obtuvo un incremento estadísticamente significativo. Este resultado evidencia que el peso corporal no se vio afectado por la sustancia de ensayo.

En el estudio de Sensibilización Cutánea, no se reportaron cambios visibles al evaluar las reacciones dérmicas, posteriores a las tres aplicaciones de inducción y posterior al desafío. En otros estudios dérmicos empleando conejos fueron obtenidos resultados negativos que han permitido clasificar a esta sustancia como potencialmente no irritante para la piel<sup>15,16</sup>. Al realizar la necropsia de las ratas Cenp:SPRD no se encontraron lesiones anátomo-patológicas.

## **Conclusiones**

Bajo las condiciones experimentales en que se realizó el estudio de Toxicidad Aguda Oral, y teniendo en cuenta que no se detectaron signos de toxicidad, no se produjeron afectaciones en el peso corporal, y no se detectaron alteraciones anátomo-patológicas, se pudo concluir que la administración a dosis única por vía oral de los Microorganismos Eficientes (ME-AgroAmbiental), no produjo toxicidad en las ratas Cenp:SPRD.

Por otra parte, considerando que en los curieles Cenp:HARTLEY no se produjeron manifestaciones clínicas de daño tóxico, ni reacciones cutáneas tanto en la fase de inducción como en la de desafío, se puede concluir que la sustancia Microorganismos Eficientes (ME-AgroAmbiental), aplicada por vía dérmica en curieles Cenp:HARTLEY, puede ser clasificado como NO SENSIBILIZANTE.

Figura 1. Comportamiento del peso corporal (g) de las ratas durante el ensayo de Toxicidad Aguda Oral.

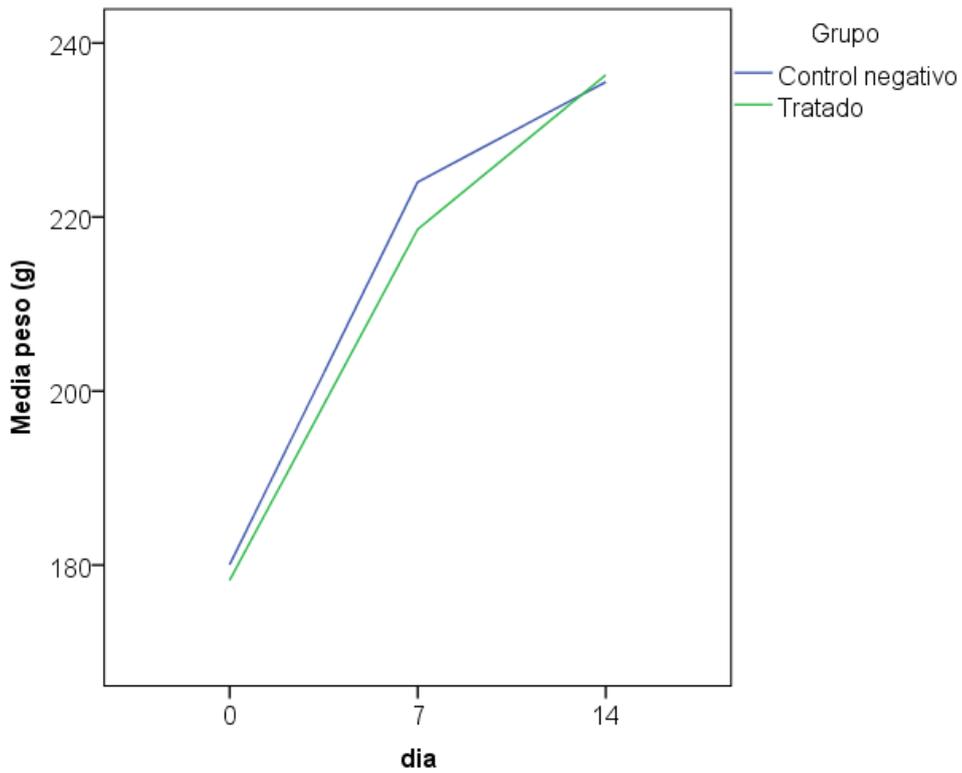
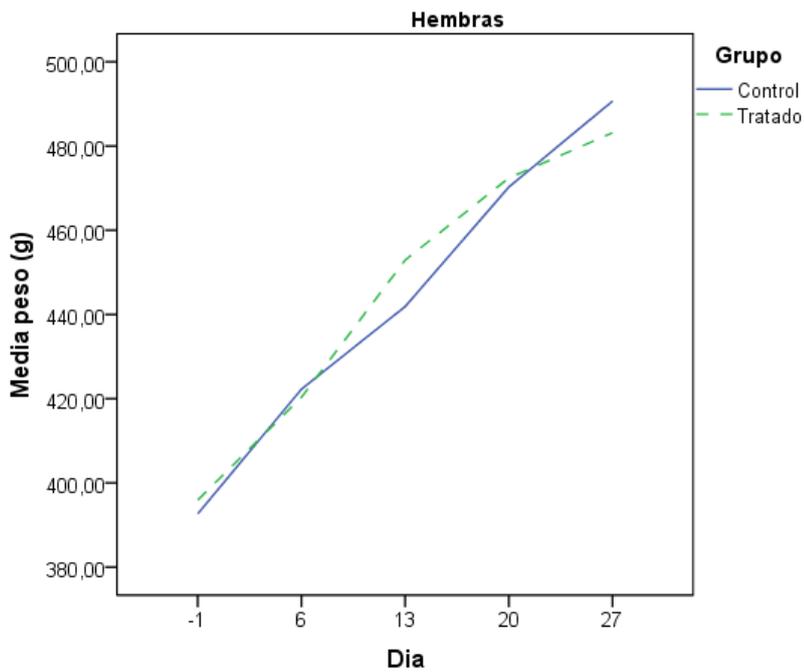
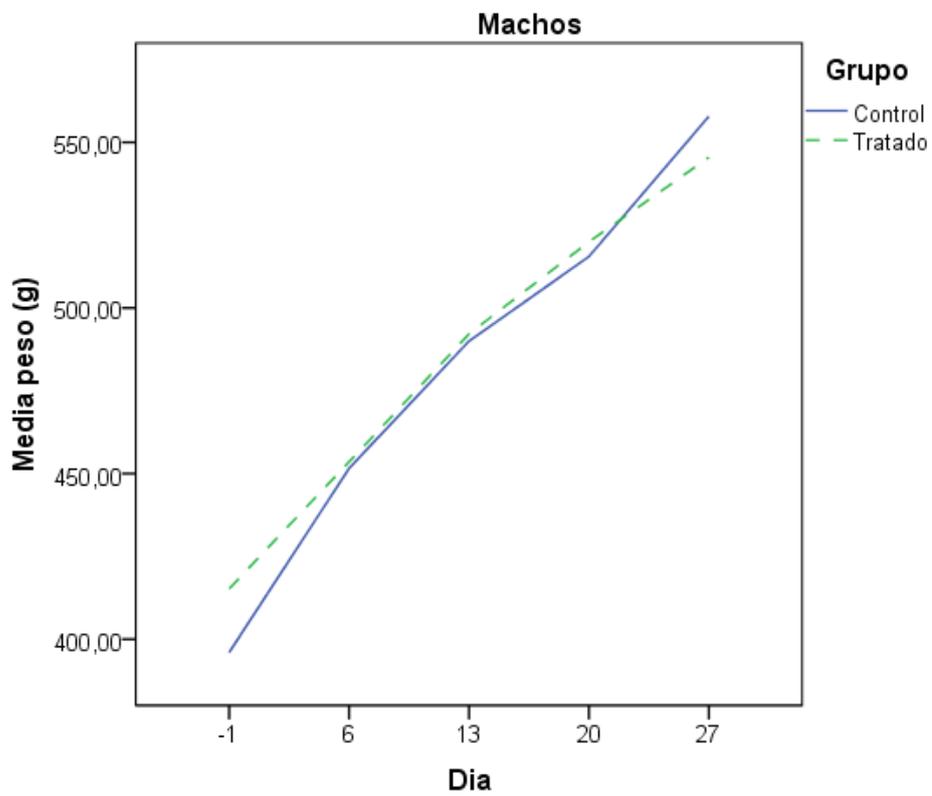


Figura 2. Comportamiento del peso corporal en los curieles hembras durante el ensayo de Sensibilización Cutánea.



**Figura 3.** Comportamiento del peso corporal en los curieles machos durante el ensayo de Sensibilización Cutánea.



---

## **Bibliografía**

- 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](http://www.fundases.com/userfiles/file/MicroorG_Benef_Efect.pdf). Consultado en Julio 2016.
- 2.** Guía de la Tecnología de EM. EM Producción y Tecnología SA (EMPROTEC) Costa Rica.
- 3.** EPA: Environmental Protection Agency. Acute Oral Toxicity. OPPTS 870.1100. 2002.
- 4.** OECD: Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. TG 420. 2001.
- 5.** EPA: Environmental Protection Agency. Skin Sensitization. OPPTS 870.2600. 1996.
- 6.** ISO. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 10. "*Test for Irritation and Delayed Hypersensitivity Sensitization*". ISO 10993-10:2002, Amd 1: 2006.
- 7.** POT: Procedimientos Operacionales de Trabajo, CETEX, CENPALAB. Cuba. Ediciones 2003-2014.
- 8.** Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental. Regulación 39/2004. MINSAP 2004.
- 9.** Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso y Reproducción de los Animales de Laboratorio. Edición 02. CENPALAB. 2007.
- 10.** Manual de Bioseguridad del CETEX. CENPALAB. Cuba. 2000.
- 11.** Instrucciones a los Proveedores. Microorganismos Eficientes. CENAPALB. 2016.
- 12.** LABTOOLS 2.0. Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. Instituto de Farmacia y Alimentos. 1996.
- 13.** PASW Statistics 18. 2009. Versión 18.0.0. para Windows.
- 14.** OECD. 2000. ENV/JM/MONO. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.

**15.**Informe final. *Ensayo de irritación dérmica de Microorganismos Eficientes en conejos*

*Cenp:NZB. Código: IDME0516. 2016*

**16.**Oliva R, Fariñas M, Núñez D, García G, Pérez Q, Naranjo M, Callico A, Bracho B,

Campa C. 2014. Estudio toxicológico de irritabilidad dérmica y oftálmica de

Microorganismos Eficientes (VersaKlin®). RETEL.

**Recibido: 22/11/18**

**Aceptado: 23/11/18**

Disponible en Retel / n°55 [Setiembre 18 - ] URL:

<https://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=988>