

Evaluación de la irritabilidad dérmica y oftálmica de las cremas cosméticas d-009a y d-009b en conejos

Evaluation of dermal and ophthalmic irritation of cosmetic creams d-009a and d-009b in rabbits

Zullyt Zamora Rodríguez*, Ariadne Gutiérrez Martínez, Leyanis Ocaña Nápoles, Daniela Urquiaga Rizo, Víctor González Canavacciolo, Eduardo Rodríguez Leyes.

*Unidad de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana, Cuba. zullyt.zamora@cnic.edu

Recibido: 21 de octubre de 2019;

Aceptado: 18 de noviembre de 2019;

RESUMEN

El D-009a y el D-009b son cremas cosméticas, que contienen una mezcla de alcoholes grasos, obtenidas de la cera de abejas y de la cera de la caña de azúcar, respectivamente. El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial irritante dérmico y oftálmico producido tras la administración única de las sustancias de ensayo. Se utilizaron conejos Nueva Zelanda machos adultos jóvenes de 1,8 a 2,2 kg de peso corporal. Los animales se dividieron en cuatro grupos de tres animales, dos grupos para irritabilidad dérmica y dos para irritabilidad oftálmica. En ambos ensayos, a un grupo se le administró la crema D-009a y al otro la de D-009b. Irritabilidad dérmica: previamente rasurada la zona de aplicación, se aplicó 0,5 g de D-009a o D-009b, se cubrió con un parche, este se retiró cuatro horas después y se realizó la observación y graduación de las reacciones en la piel a 1, 24, 48 y 72 h. Irritabilidad oftálmica: se aplicó en el saco conjuntival derecho de cada animal 0,1g de las cremas de D-009a o de D-009b. Se examinaron los ojos de cada animal aproximadamente a las 1, 24, 48 y 72 h de la administración y se registraron las reacciones observadas de acuerdo con la escala para graduar las lesiones oculares. En la piel, ambas sustancias provocaron un ligero eritema reversible, clasificándose como levemente irritantes. En cuanto a la irritabilidad oftálmica, se evidenció una inyección leve de los vasos sanguíneos, opacidad de la córnea en un animal tratado con la crema D-009b, reversible a las 72 h, clasificándose ambas sustancias como no irritantes. Se concluye que, las cremas cosméticas D-009a y D-009b se clasificaron como levemente irritantes para la piel y no irritantes para los ojos luego de una sola aplicación en conejos.

Palabras clave: D009; conejos irritación dérmica; irritación oftálmica; edema; eritema.

ABSTRACT

D-009a and D-009b are cosmetic creams, containing a mixture of fatty alcohols, obtained from beeswax and sugarcane wax, respectively. The purpose of this work was to determine the dermal and ophthalmic irritant potential produced after the single administration of the test substances. New Zealand male young adults rabbits of 1.8 to 2.2 kg of body weight were used. The animals were divided into four groups of three animals, two groups for dermal irritability and two for ophthalmic irritability. In both trials, one group was given D-009a cream and the other was D-009b. Dermal irritability: previously shaved the application area, 0.5 g of D-009a or D-009b was applied, covered with a patch, this was removed four hours later and the observation and graduation of skin reactions was performed at 1, 24, 48 and 72 h. Ophthalmic irritability: 0.1g of the D-009a or D-009b creams was applied to the right conjunctival sac of each animal. The evaluation of the degree of involvement of each of the eye structures was performed at 1, 24, 48 and 72 h after application. Each animal's eyes were examined at approximately 1, 24, 48 and 72 h after administration and the observed reactions were recorded according to the scale to graduate the eye lesions. In the skin, both substances caused a slight reversible erythema, being classified as mildly irritating. Regarding the ophthalmic irritability, a slight injection of the blood vessels, corneal opacity in an animal treated with the D-009b cream, reversible at 72 h, was evidenced, classifying both substances as non-irritants. As conclusion, the cosmetic creams D-009a and D-009b were classified as mildly irritating to the skin and not irritating to the eyes after a single application in rabbits.

Keywords: D009; rabbits; dermal irritation; ophthalmic irritation; edema; erythema.

INTRODUCCION

La irritación dérmica se define como una reacción inflamatoria local de efectos reversibles. Se caracteriza por la aparición de eritema (enrojecimiento) y edema (acumulación de líquido en el intersticio celular) tras la aplicación de un compuesto químico en una zona determinada de la piel. En los procesos agudos de irritación aparece principalmente inflamación, mientras que la irritación crónica se caracteriza fundamentalmente por una hiperproliferación y una hiperqueratosis transitoria (Berrardesca & Distante, 1994).

Los mecanismos bioquímicos implicados en la irritación dérmica son muy complejos y aún no se conocen en detalle. Un producto químico puede provocar irritación no solo mediante la destrucción directa del tejido, sino que puede alterar distintas funciones celulares provocando la formación, liberación y activación de autacoides. En la piel, los autacoides inician una cascada de reacciones que acaba provocando inflamación. Entre los autacoides encontramos la histamina, los metabolitos del ácido araquidónico, las cininas, el sistema del complemento, algunas especies reactivas del oxígeno y las citocinas (Berrardesca & Distante, 1994).

En el caso de las células epidérmicas, el mecanismo principal que utilizan para participar en las reacciones inflamatorias de la piel es la producción y liberación de citocinas. Los queratinocitos, que constituyen aproximadamente un 90 o 95 % de las células de la epidermis, son una fuente muy importante de citocinas y, por tanto, desempeñan un papel decisivo en el inicio y el mantenimiento de las reacciones inflamatorias (Mckenzie & Sauer, 1990). En condiciones normales, los queratinocitos producen algunas citocinas constitutivamente, como las interleucinas (IL) 1- alfa (Dinarello, 1998), pero también son capaces de producir otras citocinas como el Factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-8 e IL-6 en respuesta a estímulos externos (Sims *et al*, 1990). Sin embargo, entre todas las citocinas que son capaces de producir y liberar, únicamente la IL1-alfa, la IL1-beta y el TNF- α activan un número suficiente de efectores para desencadenar por sí misma un proceso inflamatorio (Kupper, 1990).

En las reacciones de irritación ocular, la córnea constituye un importante tejido del globo ocular, cuya estructura proteica muy organizada permite el paso libre de la luz a través de ella. Algunas sustancias químicas pueden alterar la estructura de la córnea hasta el punto de perder su transparencia, de modo que pueden provocar pérdida parcial de la visión o incluso ceguera. Alrededor del 80 % de la córnea está formada por estroma, una red organizada de macromoléculas, con un nivel de hidratación apropiado (Kupper, 1990).

La pérdida de la impermeabilidad transepitelial, debido a daños sobre las uniones estrechas y los desmosomas que unen las células del epitelio, es uno de los fenómenos iniciales en las lesiones inducidas por productos químicos (Bothan *et al*, 1998), de modo que si el epitelio se lesiona puede aparecer opacidad corneal. Sin embargo, niveles de opacidad menos graves pueden revertirse dado que el epitelio tiene la capacidad de auto regenerarse a través del movimiento de las células contiguas hasta cubrir la herida o mediante reemplazo de las células dañadas por división celular.

En cambio, el endotelio no es capaz de repararse. Por ese motivo, las lesiones sobre esas células pueden tener consecuencias graves como la ceguera permanente (Curren & Harbell, 1998). La conjuntiva, estructura que queda expuesta al ambiente, está formada por epitelio escamoso no queratinizado y es muy sensible a las sustancias extrañas. Por tanto, cuando una sustancia irritante entra en contacto con la conjuntiva se inicia un proceso inflamatorio que provoca dilatación de la red vascular, confiriendo un aspecto enrojecido a la membrana. Asimismo, se pueden producir cambios en la permeabilidad de los capilares, provocando edema. Algunos productos pueden provocar conjuntivitis sin afectar la córnea. Los efectos de los productos químicos sobre la conjuntiva suelen ser reversibles (Curren & Harbell, 1998).

El iris se sitúa por detrás de la córnea y se encuentra rodeada por el humor acuoso. Es una estructura vascular formada por el tejido conjuntivo laxo, fibras musculares y células pigmentadas. La irritación también puede provocar sobre esta estructura la dilatación de los vasos sanguíneos y la liberación de líquidos vasculares que provocan edema. Además, al producirse daños sobre el iris, la liberación de proteínas procedentes de la sangre del humor acuoso puede cambiar su índice de refracción provocando alteraciones de la visión. Los daños más graves pueden provocar la destrucción del tejido del iris que tiene como consecuencia la pérdida de su reactividad a la luz (Curren & Harbell, 1998).

El D-009a y el D-009b son cremas cosméticas con formulaciones a base de una mezcla de alcoholes grasos obtenidas de la cera de abejas y de la cera de la caña de azúcar, respectivamente. El D-009a contiene triacontanol como componente mayoritario, mientras que el principal componente del D-009b es el octacosanol.

Reportes previos han documentado que una mezcla de seis alcoholes grasos obtenida de la cera de abejas, que contiene al triacontanol como alcohol mayoritario (D-002) (Mas, 2001), presenta efectos anti-inflamatorios demostrados *in vivo* en modelos experimentales de inflamación aguda (Carbajal *et al*, 2013; Ravelo *et al*, 2010; Ravelo *et al*, 2013; Ravelo *et al*, 2014) y crónica (Carbajal *et al*, 1998; Molina *et al*, 2011), los cuales se han asociado a una reducción en el reclutamiento de neutrófilos hacia el tejido dañado (Valle *et al*, 2012; Carbajal *et al*, 2013), como consecuencia de la disminución de los niveles de leucotrieno B4 (LTB4) (Carbajal *et al*, 1998), eucosanoide producido por la activación de la enzima 5-lipooxigenasa (5-LOX) que presenta una potente acción quimiotáctica de neutrófilos (Di Gennaro & Haeggstrom, 2014). En tal sentido, ha sido reportado que el mecanismo que sustenta esta acción anti-inflamatoria del D-002 involucra una inhibición dual de las enzimas: 5-LOX y ciclooxigenasa (COX), con mayor afinidad sobre la 5-LOX (Pérez *et al*, 2012; Pérez *et al*, 2014). Además, el D-002 presenta efectos antinociceptivos asociados a su acción anti-inflamatoria y no a un efecto analgésico *per se* (Ravelo *et al*, 2011).

Reportes previos han documentado que el triacontanol presenta propiedades antiinflamatorias (McBride *et al*, 1987), lo cual pudiera sustentar la eficacia anti-inflamatoria del D-002 dado que este alcohol es su componente mayoritario. Además, la aplicación de triacontanol en forma de crema mostró también propiedades anti-inflamatorias en el modelo de irritación inducida por aceite de crotón y dinitrocloro-benceno en curieles, destacándose su acción antieritematosa (McBride *et al*, 1987).

Por otra parte, el D-002 presenta efectos antioxidantes demostrados en diferentes modelos experimentales, fundamentalmente de lesiones gástricas (Molina *et al*, 2001; Molina *et al*,

2005) los cuales han sido mediados por la inhibición de la oxidación de lípidos y proteínas, y asociados a la estimulación de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas: glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa (Pérez *et al*, 2013).

Teniendo en cuenta las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes del D-002, así como, los efectos anti-inflamatorios reportados para el triacontanol (su componente mayoritario), resulta lógico suponer que el D-009a presente efectos protectores en piel dada su composición de alcoholes grasos similar al D-002 con alto contenido en triacontanol.

El policosanol, mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores obtenida de la cera de caña (*Saccharum officinarum L.*), cuyo componente mayoritario es el octacosanol (Mas, 2000), presenta efectos inhibitorios sobre la actividad de la COX-1 *in vitro* (Pérez *et al*, 2013) lo que sustenta su acción como antiagregante plaquetario (Carbajal *et al*, 1998) y moderadamente anti-inflamatorio (Carbajal *et al*, 2013), los cuales unidos a sus propiedades antioxidantes (Oyarzábal *et al*, 2010), constituyen un conjunto de efectos pleiotrópicos que contribuyen a su actividad antiaterosclerótica integral (Arruzazabala *et al*, 2002; Castaño *et al*, 2006; Menéndez *et al*, 2000).

Por otra parte, ha sido reportado que el octacosanol presenta un efecto antinociceptivo periférico, probablemente mediado por los receptores alfa 2-adrenérgicos, y que inhibe tanto el flujo de leucocitos como los niveles de TNF en el modelo de pleuresía por carragenina (Marques *et al*, 2012). Por tales motivos, nos hace sugerir que el uso de la crema D-009b, rica en octacosanol, tenga efectos promisorios como dermo-protector.

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados, nos planteamos como objetivo del estudio evaluar el posible efecto irritante dérmico y oftálmico de las cremas D-009a y D-009b, respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

Sustancia de estudio

Formulación de crema de D-009a y D-009b, ambas al 2%, lotes: 230317002 y 230317001, respectivamente, procedentes del grupo de Química de la Unidad de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba (CNIC). Las sustancias son cremas semisólidas de color beige, almacenadas en frascos plásticos de alta densidad y mantenidos a temperatura ambiente.

Animales

Se emplearon conejos albinos Nueva Zelanda Blanco, machos adultos jóvenes, de 1,8 a 2,2 kg de peso corporal, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Mayabeque, Cuba.

Los conejos son la especie de elección en los ensayos de irritabilidad según establece la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (OCDE, 2012; OCDE, 2015).

A su llegada, los animales fueron alojados en condiciones ambientales requeridas de temperatura y humedad y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, que se mantuvieron durante todo el estudio. El periodo de adaptación fue de 14 d. El alimento que se les proporcionó

durante todo el estudio fue pienso estándar para esta especie preparado y suministrado por el CENPALAB. Los animales tuvieron durante todo el estudio libre acceso al alimento y al agua.

Los animales se colocaron individualmente en cada jaula y se identificaron con una chapilla en la que se recogió el código del estudio, sustancia de ensayo, especie, grupo experimental y número del animal.

Administración y dosificación

Las sustancias en ensayo (cremas D-009a y D-009b), se aplicaron por vía tópica para ambos ensayos (irritabilidad dérmica y oftálmica). En el caso de la dérmica, se aplicó en la piel directamente, previo rasurado de la zona de aplicación, y en el caso de la oftálmica se aplicó en el saco conjuntival. Ambas sustancias se aplicaron en dosis única, en el horario de la mañana. Se formaron dos grupos para cada ensayo de tres animales cada uno. En los dos ensayos, a un grupo se le administró la crema D-009a y al otro la de D-009b.

Irritabilidad dérmica.

Para este ensayo se procedió 24 h antes con el rasurado de los animales. El rasurado se realizó con una máquina eléctrica (Oster turbo A5, USA), se rasuró un área mayor de 6 cm² a ambos lados dorsales (derecho e izquierdo), el lado derecho se seleccionó como tratado y el izquierdo como control. Solamente los animales con la piel intacta fueron utilizados, a los cuales se les aplicó 0,5 g de las sustancias a evaluar (cremas de D-009a o de D-009b) (OCDE, 2015). Luego, los sitios de aplicación se cubrieron con un parche de gasa y fueron adheridos a la piel con la ayuda de una cinta adhesiva hipoalergénica, por cuatro horas, etapa en que los animales permanecieron en el cepo. Al final de este periodo se removieron los parches y se marcó la posición de los sitios.

Mediciones a realizar

Transcurrida la primera hora después de retirado el parche se realizó la primera observación. La zona de aplicación se lavó con solución salina fisiológica, sin provocar alteraciones en la superficie de la piel. Se observaron los sitios de aplicación luego de 1, 24, 48 y 72 h de la remoción del parche y se graduaron las reacciones en la piel (eritema y edema) según lo descrito en la Tabla 1 (OCDE, 2015). Se registraron los resultados para cada sitio de aplicación en cada intervalo de tiempo.

Se determinó el índice de irritación dérmico primario (IIP). Para su cálculo solo se utilizaron las observaciones de las 24, 48 y 72 h después de la remoción del parche.

La puntuación de irritación primaria para un animal se calculó dividiendo la suma de todas las puntuaciones por tres (número de observaciones). Para obtener el IIP para la sustancia de ensayo se sumaron todas las puntuaciones de irritación primaria de los animales individuales y se dividieron por tres (número de animales). Luego se siguió el criterio de clasificación descrito en la Tabla 2. (Normas Cubanas (NC) UNE EN ISO, 2015).

Irritabilidad oftálmica

No más de 24 h antes del inicio del ensayo todos los conejos fueron sometidos a un riguroso estudio de sus estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva). El daño corneal fue observado con el empleo de una solución de fluoresceína sódica al 2 %, además se utilizó una lámpara con filtro de luz violeta.

Previa selección de los animales para el ensayo, se les aplicó en el saco conjuntival del ojo derecho, después de haber sido proyectado ligeramente el párpado inferior hacia afuera, la cantidad de 0,1 g de las sustancias en ensayo. Luego, los párpados fueron mantenidos juntos durante un segundo para evitar la pérdida de la sustancia. Transcurrida una hora de aplicada las sustancias, al no eliminarse las cremas totalmente por mecanismos fisiológicos, se procedió a enjuagar el ojo con solución salina. El ojo contralateral (izquierdo) fue tomado como control y no recibió tratamiento alguno.

Se examinaron los ojos de cada animal aproximadamente a la 1, 24, 48 y 72 h de la administración con el fin de detectar daños en las estructuras antes mencionadas (córnea, iris y conjuntiva) y se registraron las reacciones observadas de acuerdo con la escala para graduar las lesiones oculares (Tabla 3) (OCDE, 2012).

Para el cálculo del Índice de Irritación Ocular (IIO) se determinó la suma de todas las observaciones en las tres estructuras analizadas y este valor fue dividido entre 12 (3 estructuras, 4 tiempos de evaluación) (García *et al*, 1988). Para el análisis del valor final del IIO, se considera como no irritante un valor hasta 10, según describe Draize *et al*, 1944.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 4 se describen los resultados del índice de irritación dérmica primaria en la piel de conejos para las formulaciones de cremas cosméticas D-009a y D-009b, también se muestran las observaciones registradas de los sitios de aplicación en los diferentes tiempos después de la remoción del parche, según lo descrito en la Tabla 1 (OCDE, 2015).

Después de retirado el parche de la zona de aplicación de las sustancias, se observó a las 24 h que la crema D-009a provocó en el primer animal un eritema grado 1, el cual se mantiene durante todo el tiempo de observación hasta los 72 h. En el animal dos, provocó a las 24 h un eritema de grado 2, que con el transcurso del tiempo a 48 y 72 h, el grado de eritema se redujo a 1. El animal número tres, no mostró signos de eritema en los tiempos tomados en cuenta para los cálculos (24, 48 y 72 h).

Dichos resultados permitieron realizar el cálculo de índice de irritación dérmico primario (IIP) para la crema cosmética D-009a que fue de 0,77, por tanto, se clasificó la sustancia como levemente irritante. Los resultados observados para la aplicación de la formulación de crema cosmética D-009b, de forma similar a la anterior, mostró en los dos primeros animales un eritema de grado 1 que se mantuvo en el tiempo 48 y 72 h, a diferencia del animal tres que sí logró a las 48 y 72 h, la reversión del eritema grado 1 observado a las 24 h. Al calcular el IIP para la crema cosmética D-009b, el resultado fue de 0,77, por tanto se clasificó como levemente irritante.

Se debe destacar que, en ninguno de los animales seleccionados para el estudio de ambas cremas cosméticas, se observó edema en la zona de aplicación ni ningún signo de toxicidad. Las reacciones observadas fueron similares en todos los animales del estudio, sin que dejara de existir su respuesta individual.

Tal como se evidenció, ambas sustancias ensayadas se clasificaron como levemente irritantes, sin que se observaran reacciones edematosas, pero producen un ligero enrojecimiento en la piel de los conejos sin que conduzca a una reacción inflamatoria con formación edematosa intersticial. Por otra parte, debemos considerar que este tipo de ensayo realizado en animales (conejos) con pieles altamente sensibles a cualquier sustancia, aunque no nos permite extrapolar fielmente este resultado a la piel de los humanos, si nos brinda la información necesaria para que pueda ser utilizado en humanos con una alta seguridad.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del ensayo de irritación oftálmica de las cremas cosméticas D-009a y D-009b. Ambas cremas tuvieron un comportamiento similar. Una hora después de la aplicación de ambas sustancias y en los tres animales ensayados, se presentó una ligera inyección de los vasos sanguíneos, reacción clasificada como grado 1. En el iris al igual que en la córnea no se observaron cambios, con excepción del animal número dos al cual se le aplicó la crema D-009b, que desarrolló una opacidad corneal de grado 2, la cual fue revertida a las 72 h de observación. Los cálculos de los índices de irritación oftálmico fueron de 0,25 para la crema cosmética D-009a y de 0,42 para la crema cosmética D-009b, clasificándose ambas sustancias como no irritantes, ya que el índice calculado fue menor que 10 (García *et al*, 1988; ISO 10993-10:2015). Considerando el objetivo de ambos ensayos (irritabilidad dérmica y oftálmica), se demostró la seguridad de las cremas cosméticas D-009a y D-009b. Por tanto, se sugiere que ambas pueden ser aplicadas con seguridad en la piel de los humanos. Adicionalmente, en caso de ocurrir la aplicación accidental de dichas cremas en la zona oftálmica, igualmente no será objeto de irritación alguna. Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la seguridad tanto dérmica como oftálmica de ambas formulaciones de cremas.

Tabla 1. Clasificación de reacciones en la piel.

Reacción	Puntuación
Formación de eritema y de escara	
Ausencia de eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo a formación de escara impidiendo su clasificación	4
Formación de edema	
Ausencia de edema	0
Edema muy leve (apenas perceptible)	1
Edema leve (bordes del área bien definidos por elevación definida)	2
Edema moderado (elevación de aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (elevación mayor de 1 mm y extendiéndose más allá del área de exposición)	4

Tabla 2 - Categorías del índice de irritación dérmica primaria o acumulativa en un conejo.

Puntuación media	Categoría de la respuesta
0 a 0,4	Insignificante
0,5 a 1,9	Leve
2 a 4,9	Moderada
5 a 8	Grave

Tabla 3. Clasificación de las lesiones oculares

Estructura	Descripción	Puntuación
Córnea	Opacidad: grado de densidad (las lecturas deben tomarse de la zona más densa y el área de opacidad corneal debe notarse)	
	Sin ulceración ni opacidad	0
	Zonas de opacidad dispersas o difusas (con excepción del ligero mate del brillo normal); detalles del iris claramente visibles	1
	Zona traslúcida fácilmente perceptible; detalles del iris ligeramente oscurecido	2
	Zona nacarada; no se observan los detalles del iris; tamaño de la pupila apenas perceptible	3
	Córnea opaca; no se distingue el iris por la opacidad	4
Iris		
	Normal	0
	Pliegue marcadamente profundizado, congestión, hinchazón, hiperemia circuncorneal moderada; o inyección; iris reactivo a la luz (una reacción lenta se considera un efecto)	1
	Hemorragia, destrucción visible o ausencia de reacción a la luz	2
Conjuntiva	Enrojecimiento (se refiere a las conjuntivas palpebral y bulbar, excluyendo la córnea y el iris)	
	Normal	0
	Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (inyectados)	1
	Difusa, color carmesí; vasos individuales no fácilmente discernibles	2
	Rojo carne difuso	3
Quemosis	Inflamación (se refiere a los párpados y/o membranas nictitantes)	
	Normal	0
	Alguna inflamación por encima de lo normal	1
	Inflamación evidente, con eversión parcial de los párpados	2
	Inflamación, con párpados más de la mitad cerrados	4

Tabla 4. Resultados del índice de irritación dérmica primaria de las cremas D-009a y D-009b.

Crema D-009a lote:230317002. Crema D-009 b, lote: 230317001.

Sitio de la piel	Tiempo h			Total
D-009a	24	48	72	
1	1	1	1	3
2	2	1	1	4
3	0	0	0	0
				7
Índice de Irritación dérmica primaria = 0,77 (Levemente irritante)				
D-009 b				
1	1	1	1	3
2	1	1	1	3
3	1	0	0	1
				7
Índice de Irritación dérmica primaria = 0,77 (Levemente irritante)				

Tabla 5. Resultados del índice de irritación oftálmica de las cremas D-009a y D-009 b.

D-009a	Resumen de las observaciones			Total
	Conjunt.	Iris	Córnea	
1	1	0	0	1
2	1	0	0	1
3	1	0	0	1
				3
Índice de Irritación =0,25 (No irritante)				
D009b	Resumen de las observaciones			Total
	Conjunt.	Iris	Córnea	
1	1	0	0	1
2	1	0	2	3
3	1	0	0	1
				5
Índice de Irritación =0,42 (No irritante)				

Crema D-009a lote:230317002. Crema D-009 b, lote: lote 230317001

CONCLUSIONES

Las cremas cosméticas D-009a y D-009b se clasificaron como levemente irritantes para la piel y no irritantes para los ojos luego de una sola aplicación en conejos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arruzazabala, M.L., Molina, V., Más, R., Fernández, L., Carbajal, D., Valdés, S., *et al.* (2002). Antiplatelet effects of policosanol 20 and 40 mg/d in healthy volunteers and dyslipidemic patients. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29(10), 891-897.

Berardesca, E., & Distanto, F. (1994). The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis*, 31, 281-287.

Bothan, P.A., Earl, L.K., Fentem, J.H., Roguet, R., & Van de sandt, J.J.M. (1998). Alternative methods for skin irritation testing: the status. *ATLA*, 26,195-211.

- Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., Valdés, S., & Más, R. (1998). Effects of policosanol on platelet aggregation and serum levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. *ProstaglLeuk Essential Fatty Acids*, 58(1), 61-64.
- Carbajal, D., Molina, V., Noa, M., Ravelo, Y., Mas, R., & Valle, M. (2013). Comparative effects of D-002 (beeswax alcohols), ranitidine and omeprazole on acetic acid-induced ulcer. *Int J Pharmacy Pharm Sci*, 5, 91-95.
- Carbajal, D., Molina, V., Valdés, S., Arruzazabala, M.L., Más, R., & Magraner, J. (1998). Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 59(4), 235-238.
- Carbajal, D., Ravelo, Y., Molina, V., Mas, R., & Arruzazabala, M.L. (2013) Effect of D-002 on models of acute inflammation. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 21, 62-67.
- Carbajal, D.Q., Molina, V.C., Ravelo, Y.C., Pérez, Y.G., Oyarzabal, A.Y., & Mas, R.F. (2013). Efectos del policosanol en los modelos de pleuresía inducida por carragenina y granuloma por algodón. *Revista Cubana de Farmacia*, 47(4), 492-501.
- Castaño, G., Arruzazabala, L., Fernández, L., Mas, R., Carbajal, D., Molina, V., *et al.* (2006). Effects of combination treatment with policosanol and omega-3 fatty acids on platelet aggregation. A randomized double-blind clinical study. *Cur Therapeutic Res*, 67(3), 174-192.
- Curren, R.D., & Harbell, J.W. (1998). In vitro alternatives for ocular irritation. *Environ Health*, 106, Suppl 2, 485-492.
- Di Gennaro, A., & Haeggström, J.Z. (2014). Targeting leukotriene B4 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets*, 18, 79-93.
- Dinarelo, C.A. (1998). Interleukin 1, interleukin 1 receptor and interleukin 1 receptor antagonist. *Intern Rev Immunol*, 16, 457-499
- Draize, J.H., Woodard G., & Calvery, H.O. (1944). Methods to the study of the irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82 (3), 377-390.
- García, S.G., Palacios, Á.M., Pérez, P.L., García, A.R., Díaz, M.G., & Gazapo, P.R. (1988). Elaboración de una metodología para evaluar la irritabilidad oftálmica. Validación con distintos métodos. *Rev Cub Farm*, 22(2), 5-24.
- ISO 10993-10:2015. Norma Cubana, Biological evaluation of medical devices. Part 10: Test for irritation and delayed -type hypersensitivity. UNE EN ISO 10993-10:2015.
- Kupper, T.S. (1990). Immune and inflammatory process in cutaneous tissues. Mechanism and Speculations. *J Clin Invest*, 86, 1783-1789.
- Marques, A.O., Conserva, L.M., Souza, J.N. F., Almeida, F.B., Lyra, R.P.L & Barreto, E. (2012). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Octacosanol from the Leaves of *Sabiceagrisea* var. *grisea* in Mice. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 1598-1611.

- Mas, R. (2000). Policosanol. *Drugs of the Future*, 25(6), 569-586.
- Mas, R. (2001). D-002: A product obtained from beeswax. *Drugs of the Future*, 26, 731-744.
- McBride, P.T., Clark, L., & Krueger, G.G. (1987). Evaluation of Triacontanol-Containing Compounds as Anti-Inflammatory Agents Using Guinea Pig Models. *Journal of Investigative Dermatology*, 89(4), 380-383.
- Mckenzie, R.C., & Sauer, D.N. (1990). The role of keratinocytes cytokines in inflammation and immunity. *J of Investigative Dermatology*, 95, 1055-1075.
- Menéndez, R., Más, R., Amor, A., Fernández, J.C., & González, R.M. (2000). Effects of Policosanol on the low density lipoprotein (LDL) isolated on hypercholesterolemic patients at high coronary risk to in vitro copper-mediated lipid peroxidation. *Curr Ther Res*, 61, 609-620.
- Molina, V., Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., & Más, R. (2005). Therapeutic effect of D-002 (Abexol) on gastric ulcer induced experimentally in rats. *Journal of Medicinal Food*, 8, 59-62.
- Molina, V., Ravelo, Y., Carbajal, D., Más, R., & Arruzazabala, M.L. (2011). Anti-inflammatory and gastric effects of D-002, aspirin and naproxen and their combined therapy in rats with cotton pellet-induced granuloma. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30(9), 1709-1713.
- Molina, V., Valdés, S., Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., Menéndez, R., & Mas, R. (2001). Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with experimentally-induced injury. *J Med Food*, 4,79-83.
- OECD, 2012. Acute eye irritation /corrosion. Methods 405. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- OECD, 2015. Acute dermal irritation /corrosion. Methods 404. OECD Guidelines for testing of chemicals.
- Oyarábal, A., Molina, V., Jiménez, S., Curveco, D., & Mas, R. (2010). Efectos del policosanol, el extracto de semillas de uva y su terapia combinada sobre marcadores oxidativos en ratas. *Rev Cubana Farm*, 45(1),87-96.
- Pérez, Y., Mas, R., Oyarábal, A., Jiménez, S., & Molina, V. (2013). Effects of policosanol (sugar cane wax alcohols) and D-003 (sugarcane wax acids) on cyclooxygenase (COX) enzyme activity in vitro. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 19 (2), 18-23.
- Pérez, Y., Oyarábal, A., Mas, R., Molina, V., & Jiménez, S. (2013). Protective effect of D-002, a mixture of beeswax alcohols, against indomethacin-induced gastric ulcers and mechanism of action. *J. Nat Medicine*, 67(1),182-189.
- Perez, Y., Oyarábal, A., Molina, V., Mas, R., Jiménez, S., Molina, V., et al. (2012). Effect of D-002 on 5-lipooxygenase activity in vitro. *Rev Cubana Farm*, 46, 259-266.

Pérez, Y., Oyarzábal, A., Ravelo, Y., Mas, R., Jiménez, S., & Molina, V. (2014). Inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase enzymes by D-002 (beeswax alcohols). *Top Curr Nutraceutical Res*, 12, 13-18.

Ravelo, Y., Molina, V., Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., Mas, R., Oyarzabal, A., *et al.* (2010). Effects of single oral and topical administration of D-002 (beeswax alcohols) on xylene induced ear edema in mice. *Lat Am J Pharm*, 29, 1451-1454.

Ravelo, Y., Molina, V., Carbajal, D., Fernández, L., Fernández, J.C., Arruzazabala, M.L., Más, R. (2011). Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (beeswax alcohols). *J Nat Med*, 65(2), 330-335.

Ravelo, Y., Molina, V., Oyarzábal, A., Pérez, Y., Noa, M., Mas, R., Jiménez, S., & Mendoza N. (2016) Effects of D002 (Beeswax Alcohols) on Lung Leukocyte Infiltration and Lipid Peroxidation in Rats with Carrageenan Induced Pleurisy. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 38(1), 8-12.

Ravelo, Y., Molina, V., Pérez, Y., Oyarzábal, A., Jiménez, S., Mas, R. *et al.* (2013). Anti-oedema effects of D-002 and Lyprinol on the carrageenan-induced pleurisy in rats. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 23, 24-28.

Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., *et al.* (1990). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*, 6155-6159.

Valle, M., Noa, M., Mendoza, S., Oyarzábal, A., Molina, V., Mendoza, N., *et al.* (2012). Effects of D-002 on aspirin-induced ulcers and neutrophil infiltration on the gastric mucosa. *Revista Cubana de Farmacia*, 46, 49-58.