Acta Farm. Bonaerense **24** (4): 521-6 (2005)
Recibido el 19 de julio de 2004
Aceptado el 18 de julio de 2005

Evaluación Toxicológica y Efecto Antiacné de Cremas de Agua y Fango Mineral

Alicia LAGARTO, Raimara GONZÁLEZ, Viviana BUENO,
Raiza VEGA, Nilia de la PAZ, Iván MORALES, Yamile VEGA,
Carmen CARRILLO, Reina PIMIENTA, Isbel GUERRA & Ingrid BERNAL

Unidad de Ciencia y Técnica de Base Control Biológico.
Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Calle 17 N° 6208 e/ 62 y 64. Playa.
Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN. Fue evaluado el efecto antiacné y el potencial tóxico de cuatro cremas conteniendo agua y fango mineral al 25% y 40% del Balneario de San Diego de los Baños ubicado en Pinar del Río, Cuba, a través de los ensayos de estimulación androgénica de las glándulas sebáceas en oreja de hámster y de irritación dérmica, ocular y fototoxicidad. En el ensayo de irritación dérmica fueron aplicados 0,5 g de cada una de las cremas sobre la piel de conejos albinos Nueva Zelanda machos. En el ensayo de irritación ocular se aplicaron 0,1 g de las cremas sobre las estructuras oculares de conejos. El ensayo de fototoxicidad se realizó aplicando 50 µg sobre la piel de cobayos albinos Hartley de ambos sexos. Para la actividad farmacológica fueron aplicados, vía dérmica, 0,1 g de las cremas sobre la oreja de hámster Sirios Dorados hembras estimulados androgénicamente por inyección intramuscular de 80 µg/mL de testosterona propionato, con el objetivo de evaluar su efecto antiacné. Las cremas ensayadas se clasificaron como no irritantes para el ensayo de irritación dérmica y ocular y no fototóxicas, mostrando la seguridad necesaria para su empleo clínico. La estimulación androgénica produjo un aumento significativo (p<0,01) del tamaño de las glándulas sebáceas respecto al grupo no estimulado androgénicamente. Las cuatro cremas administradas produjeron una significativa disminución (p<0,01) del tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja de hámsters estimulados androgénicamente. El efecto obtenido fue sistémico, evidenciado por la semejanza en el tamaño de las glándulas sebáceas entre las orejas tratadas con las cremas y las orejas no tratadas.

SUMMARY. "Toxicological Evaluation and Antiacne Effect of Mineral Water and Mud Creams". Four creams containing 25% and 40% of mineral water and mud from San Diego de los Baños Resort, located in Pinar del Río, Cuba, were evaluated for dermic and eye irritation, phototoxicity assay and antiacne properties. In dermal irritation assay 0.5 g of the creams was applied on the skin of male New Zealand albino rabbits. In eye irritation assay 0.1g of the creams were applied on the ocular structures of rabbits. The phototoxicity assay was carried out applying 50 µg on the skin of both sexes Hartley albino guinea pigs. For antiacne activity assay 0.1 g of the creams was applied on right pinna of female Syrian golden hamsters androgenic stimulated by 80 µg/mL testosterone propionate intramuscular injection. The creams were classified as no irritant for dermic and eye irritation assays and no phototoxic. Androgenic stimulation caused a significant size increase of the sebaceous glands (p<0.01) as compared to the group that did not receive androgenic stimulation. These four creams applied produced a significant decrease (p<0.01) of the size of the sebaceous glands of the hamster ears with androgenic stimulation. The effect was systemic due to the similarity in the size of sebaceous glands in both, treated and untreated side. The creams under study results no irritant to eye and skin and no phototoxic. Results prove the innocuity of four mud and mineral waters creams necessary for clinic used.

INTRODUCCIÓN

El uso de las aguas y fangos mineromedicinales siempre ha tenido gran importancia debido a las propiedades curativas de estas. Su contenido en sales y otros elementos como sulfuro de hidrógeno, sulfatos, bicarbonatos, dióxido de carbono, arsénico e hierro le confieren estas propiedades curativas en enfermedades reumáticas (osteoartritis, osteoartrosis, artritis reumatoide) y dermatológicas (psoriasis, dermatitis atópica, envejecimiento de la piel, trastornos seborréicos, serosis idiopática, acné y urticaria) [1-4].

PALABRAS CLAVE: Actividad antiacné, Aguas y fango mineromedicinal, Cremas, Fototoxicidad, Irritación dérmica, irritación ocular.
KEY WORDS: Antiacne effect, Creams, Dermic irritation, Eye irritation, Mud and mineral water, Phototoxicity.

* Autor a quien debe ser enviada la correspondencia. *E-mail:* cinfa@infomed.sld.cu 2

Actualmente estas afecciones son tratadas con baños de aguas saladas y sulfurosas así como con el empleo de la fangoterapia [5].

En nuestro centro se han formulado varias cremas empleando las aguas y fangos mineromedicinales del balneario de San Diego de los Baños ubicado en la provincia de Pinar del Río, Cuba, con el propósito de emplearlas en la terapia del acné. El incremento de la secreción sebácea es uno de los factores en la patogénesis del *acne vulgaris,* que es inducido por la unión de la dihidrotestosterona a los receptores androgénicos de la piel [6]. Por tanto en el estudio del efecto de drogas con actividad antiacné se emplea la estimulación androgénica de las glándulas sebáceas del lado ventral de la oreja del hámster como modelo animal.

El presente trabajo tiene como objetivo la evaluación de la actividad antiacné de cuatro cremas de agua y fangos mineromedicinales sobre las glándulas sebáceas de la oreja de hámster estimulada androgénicamente y del potencial irritante dérmico, ocular y fototóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancia de prueba

Las cremas empleadas en el ensayo fueron elaboradas en la Unidad de Ciencia y Técnica de Base Tecnologías Básicas, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), a partir de las aguas y fangos mineromedicinales del balneario de San Diego de los Baños, Pinar del Río, Cuba, al 25 y 40% empleando una base emulsionada aceite en agua (excipiente lavable). Las mismas cumplieron con el ensayo de conteo microbiológico. Los lotes y los resultados de la caracterización física se describen en la Tabla 1.

Para el ensayo de fototoxicidad se empleó como control positivo 8-metoxipsoraleno (0,29 mg/kg) disuelto en alcohol 96%.

Las aguas y fangos minerales del Balneario de San Diego de los Baños poseen la siguiente composición química (Datos no publicados. Padilla R. & Carreras W. Informe de Ensayo. CEADEN, Cuba, 1997. Sánchez L. & Hernández J. Informe de Ensayo. Laboratorio José Isaac del Corral, Cuba, 1993). *Composición química del fango:* Si 29,8%, Fe 3,12%, Ca 1,67%, Na 0,9%, K 0,79%, Mg 0,74%, Ti 0,44%, Ba 110 ppm, Br 89 ppm, Zn 84 ppm, Rb 55 ppm, Ce 54 ppm, Pb 29 ppm, Ra 28 ppm, I 23 ppm, As 18 ppm, Th 7 ppm, U 3 ppm. *Composición química del agua mineral:* SO_4^{2-} 752,3 mg/L, Ca^{+2} 348,7 mg/L, HCO_3^- 293,6 mg/L, Mg^{2+} 38,8 mg/L, Cl^- 38,3 mg/L, Na^{2+} 34,5 mg/L, H_3SiO_3 20,6 mg/L, S^{2-} 10,1 mg/L, Sr^{2+} 3,73 mg/L, K^+ 1,64 mg/L, F- 1,11 mg/L, Hg 1 µg/L, I^- 0,91 mg/L, NH_4^+ 0,89 mg/L, Br^- 0,66 mg/L, Zn^{2+} <0,50 mg/L, Li^+ <0,50 mg/L, PO_4^{3-} <0,4 mg/L, Ni^{2+} <0,25 mg/L, NO^{3-} 0,2 mg/L, Mn^{2+} <0,20 mg/L, Fe (total) 0,11 mg/L, Cu2+ <0,05 mg/L, Pb^{2+} <0,02 mg/L, NO_2^- <0,02 mg/L, Cr^{6+} <0,005 mg/L, Cd^{2+} <0,001 mg/L, Ag^+ <0,001 mg/L.

Animales

Para la determinación del potencial irritante ocular y dérmico se emplearon conejos albinos Nueva Zelandia machos, pesando entre 1,8 y 2,0 kg. Para el ensayo de fototoxicidad se emplearon cobayos albinos Hartley de ambos sexos, con peso corporal de 300-500 g.

Para el ensayo farmacológico se emplearon hámster Sirios Dorados hembras con 110-120 g de peso corporal. Todos los animales fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y mantenidos en cuarto con temperatura controlada de 20 ± 2 °C con un ciclo de luz /oscuridad de 12-12 h. La alimentación consistió en dieta standard para roedores, conejos y curieles y agua a voluntad.

Evaluación toxicológica

Ensayo de irritación ocular

Este ensayo se llevó a cabo según lo descrito por la norma Nº 405 de la OECD [7]. Para el mismo se emplearon tres conejos por cada formulación, los cuales fueron sometidos, en las 24 h

Sustancia de prueba	Lote	Caracterización física	
		pH	Cenizas totales (%)
Crema de agua y fango mineromedicinal 25%	E-13	8,00	23,45
Crema de agua y fango mineromedicinal 40%	E-9	7,91	37,77
Crema de fango mineromedicinal 25%	E-8	7,37	24,51
Crema de fango mineromedicinal 40%	E-8	7,95	35,49

Tabla 1. Resultados de la caracterización física realizadas a las cremas de agua y fango mineral.

previas al ensayo, a un examen riguroso de sus estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva) para descartar la presencia de algún daño.

El día del ensayo fue instilado 0,1g del material en el ojo derecho, el ojo izquierdo fue utilizado como control. Ambos ojos fueron examinados aproximadamente a las 1, 24, 48 y 72 h posteriores a la aplicación inicial para detectar la presencia de eritema, edema, secreciones anormales, reacción del iris a la luz y alteraciones de la córnea. Posteriormente se procedió a la determinación del Indice de Irritación Ocular y a la clasificación de las sustancias de acuerdo a las siguientes categorías [8]: $0 \leq x < 10$ no irritante, $10 \leq x < 20$ irritante ligero, $20 \leq x < 30$ irritante moderado, $30 \leq x \leq 110$ irritante severo.

Ensayo de irritación dérmica

Este ensayo se llevó a cabo según lo descrito en la norma OECD Nº 404 [9]. El día antes del ensayo los animales fueron depilados y rasurados en el área dorsal del lomo a una distancia suficiente de la columna vertebral para proceder a la aplicación y observación de los sitios de ensayo. Se seleccionaron tres conejos, por cada sustancia de prueba, con la piel intacta a los cuales se les aplicó 0,5 g de la sustancia sobre la piel durante 4 h. Los sitios de aplicación fueron cubiertos con parche de gasa que fueron adheridos a la piel con cinta hipoalergénica. Al finalizar este período los parches fueron retirados y una vez marcado el sitio de aplicación, se removieron los remanentes de la sustancia de ensayo empleando agua estéril. Las observaciones se realizaron a las 0,5, 1, 24, 48 y 72 h después de la remoción del parche, registrando las reacciones sobre la piel para eritema y edema, las cuales fueron empleadas para el cálculo del índice de irritación. Las cremas fueron clasificadas según el índie de irritación obtenido y de acuerdo a la siguiente escala [10]: 0-0,4 no irritante, 0,5-1,9 irritante ligero, 2,0-4,9 irritante moderado y 5,0-8,0 irritante severo.

Ensayo de fototoxicidad

Este ensayo fue realizado siguiendo la metodología descrita por Nilsson *et al.* [11]. Se emplearon 5 animales de cada sexo por cada grupo de tratamiento, que fueron distribuidos en los siguientes grupos:

Grupo I: Crema de agua y fango mineromedicinal 25% + Irradiación

Grupo II: Crema de agua y fango mineromedicinal 40% + Irradiación

Grupo III: Crema de fango mineromedicinal 25% + Irradiación

Grupo IV: Crema de fango mineromedicinal 40% + Irradiación

Grupo V: Control de Irradiación

Grupo VI: Control positivo (8-metoxipsoraleno 0,29 mg/kg).

El día antes del ensayo los animales fueron depilados y rasurados en la región escapular en un área de 4 x 4 cm. Fueron aplicados 50 µg de la sustancia de ensayo sobre la piel rasurada de los cobayos. Al cabo de 30 min se efectuó la irradiación, la cual se mantuvo durante 2 h, para lo cual se utilizó una lámpara con filtro de 2 longitudes de onda de luz ultravioleta (UVA y UVB). Se empleó una λ de 365 nm cuya intensidad es de 7mW/cm^2 y una dosis de exposición de 50,4 J/cm^2. Las observaciones se realizaron a las 24, 48 y 72 h después de la aplicación de las sustancias, registrando las reacciones sobre la piel para eritema y edema.

Al finalizar las observaciones los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. En caso de detectar cualquier alteración macroscópica en la piel se tomaron muestras de las mismas para realizar el análisis histopatológico. La obtención de un valor de 2 ó más en las observaciones macroscópicas confirmado histopatológicamente, fue el criterio seguido para considerar el producto como fototóxico.

Evaluación Farmacológica

Los hámsters fueron divididos en 6 grupos de ensayo (n=5) según el siguiente esquema [6]:

Grupo I. Control (no estimulado androgénicamente)

Grupo II. Estimulación androgénica

Grupo III. Estimulación androgénica + Crema de agua y fango mineromedicinal 25%

Grupo IV. Estimulación androgénica + Crema de agua y fango mineromedicinal 40%

Grupo V. Estimulación androgénica + Crema de fango mineromedicinal 25%

Grupo VI. Estimulación androgénica + Crema de fango mineromedicinal 40%

Estimulación androgénica

La estimulación androgénica se llevó a cabo administrando intramuscularmente 80 µg de testosterona propionato disuelto en 1 mL de aceite vegetal a los grupos del II al VI, en días alternos durante 14 días, los animales del grupo I fueron inyectados con 1 mL de aceite vegetal [6].

Aplicación de la sustancia de prueba

Los grupos del III al VI fueron administrados además con 0,1 g de la crema correspondiente según el esquema de tratamiento, en el lado

ventral de la oreja derecha durante 14 días. La oreja izquierda no recibió tratamiento alguno sirviendo como control [6].

El día 15 fueron sacrificados los animales por inyección intraperitoneal de 80 mg/kg de pentobarbital sódico con el objetivo de extraer las orejas completas de los animales en estudio, para ser procesadas histopatológicamente y determinar el tamaño de las glándulas sebáceas [6].

Determinación del tamaño de las glándulas sebáceas

A cada oreja obtenida se le retiró el cartílago con ayuda de una pinza fina y se procedió a incubar a temperatura ambiente durante 1 h en solución de cloruro de calcio 1M, con el propósito de separar la dermis de la epidermis. La dermis obtenida fue teñida con coloración especial Sudán III, para la observación en microscopio de un área de 5 o más glándulas sebáceas, la cual incluye todos los acinos sebáceos ligados a una unidad polisebácea en cada espécimen.

El tamaño de las glándulas sebáceas fue determinado con un analizador computarizado SAMSUMG, con programa diseñado para estudios morfométricos denominado DIGIPAT.

Los tamaños de las glándulas sebáceas fueron dados en μm^2 y expresados como la media ± desviación estándar. La comparación estadística se realizó mediante un análisis de varianza de una vía y un test Duncan posteriormente, tomando una significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Evaluación toxicológica

Ensayo de irritación ocular.

Una hora posterior a la administración de la crema de fango mineromedicinal 40% se observó eritema y lesiones en la córnea de grado 1 en un animal. Las alteraciones a nivel de conjuntiva desaparecieron a las 24 h, las que se encontraron a nivel de córnea se mantuvieron durante todo el ensayo. Para la crema de agua y fango mineromedicinal 40 % se observó eritema y secreción una hora después de la administración en todos los animales, posteriormente las alteraciones a nivel de conjuntiva desaparecieron. Para el resto de las cremas se observó eritema, edema, secreciones y lesiones a nivel de córnea una hora después de la administración. En el resto de las observaciones desaparecieron las alteraciones de conjuntiva y las de córnea se mantuvieron constantes aunque en un menor grado. El índice de irritación ocular obtenido para la crema de fango mineral 25% fue de 7,92, 2,42 para la crema de fango mineral 40%, 8,08 para la crema de agua y fango mineral 25% y 2,50 para la crema de agua y fango mineral 40%. Todas las cremas clasificaron como no irritantes.

Ensayo de irritación dérmica

No se observó la presencia de edema ni eritema sobre la piel obteniéndose un índice de irritación primario de 0 para las 4 cremas correspondiéndose a la clasificación de no irritante.

Ensayo de fototoxicidad

Transcurridas 24 h de la irradiación se observó eritema de grado 4 en todos los animales del grupo control positivo y al cabo de las 72 h se observaron escaras. Esta respuesta fototóxica al 8-metoxipsoraleno fue confirmada histopatológicamente observándose presencia de costra, incremento de neutrófilos, acantosis ligera, desorganización de fibras colágenas, pérdida de integridad del tejido adiposo del sub-cutis, hiperqueratosis e incremento de vasos sanguíneos.

En el grupo V no se encontraron lesiones en la piel, al igual que los grupos tratados con las cremas de fango, las cuales no desarrollaron reacciones fototóxicas.

Evaluación Farmacológica

El tamaño de las glándulas sebáceas de la oreja tratada para cada grupo de tratamiento y el porcentaje de inhibición obtenido en el ensayo se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Entre el grupo control y el grupo estimulado androgénicamente se observaron diferencias altamente significativas ($p<0,01$), reflejando la efectividad de la estimulación androgénica. Igualmente se obtuvo una disminución significativa ($p<0,01$) en el tamaño de las glándulas sebáceas en la oreja tratada con las cuatro cremas de agua y fango mineral respecto al grupo estimulado androgénicamente que no recibió tratamiento. Los valores obtenidos para los grupos tratados fueron similares al tamaño de las glándulas sebáceas del grupo control no estimulado. Los por cientos de inhibición obtenidos no fueron diferentes significativamente entre los cuatro grupos que recibieron tratamiento.

El análisis estadístico reflejó que no existen diferencias significativas entre el tamaño de las glándulas sebáceas de ambas orejas (tratada y no tratada) para todos los grupos de ensayo. Estos resultados se observan en la Tabla 2.

DISCUSIÓN

El empleo de las aguas y fangos mineromedicinales tiene sus orígenes en la antigüedad [12]. Estos se utilizan generalmente para tratar dolen-

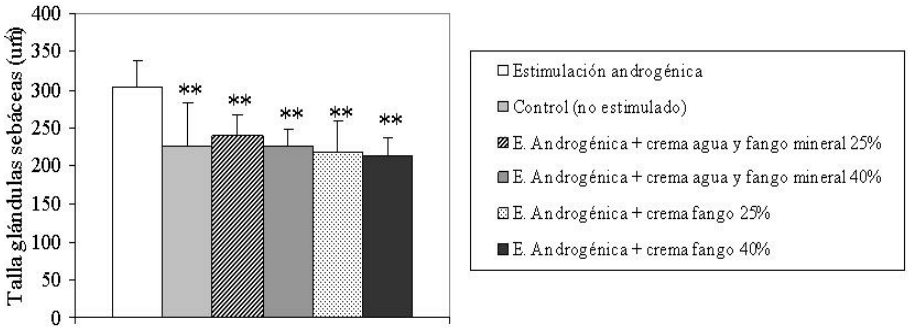

Figura 1. Tamaño de las glándulas sebáceas (μm^2) de las orejas tratadas para cada grupo de ensayo.
** Diferencias significativas respecto al grupo con Estimulación androgénica, p<0,01.

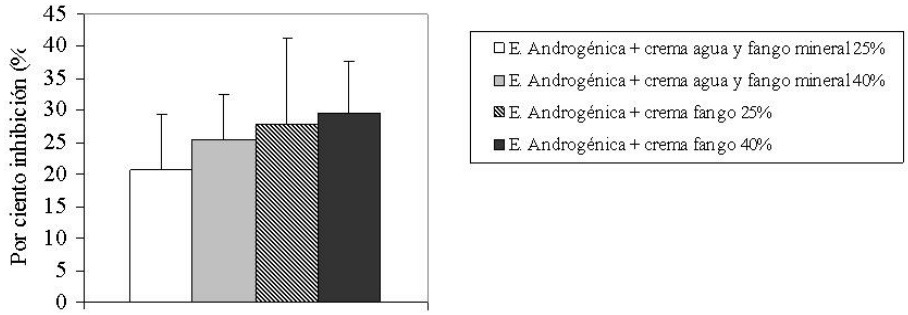

Figura 2. Por ciento de inhibición del tamaño de las glándulas sebáceas para cada grupo de ensayo. No se observaron diferencias significativas entre el efecto obtenido para cada grupo (p<0,05).

Tratamiento	Tamaño de glándulas sebáceas (μm^2)	
	Oreja tratada	Oreja no tratada
Estimulación androgénica + crema agua y fango mineral 25%	239,88 ± 26,46	214,39 ± 75,75
Estimulación androgénica + crema agua y fango mineral 40 %	225,85 ± 21,30	223,40 ± 44,13
Estimulación androgénica + crema fango mineral 25%	218,47 ± 40,63	234,22 ± 28,38
Estimulación androgénica + crema fango mineral 40%	213,05 ± 24,09	206,57 ± 28,58

Tabla 2. Tamaño de las glándulas sebáceas (μm^2) de las orejas tratadas y no tratadas para los diferentes grupos de ensayo. No se observan diferencias significativas entre las glándulas sebáceas de la oreja tratada y no tratada (p<0,05).

cias dermatológicas, fundamentalmente para enfermedades crónicas de la piel y alteraciones del cutis. Las máscaras faciales de fango seguidas por lavados con agua termal caliente son muy beneficiosas para el tratamiento del acné [5,13].

La eficacia del tratamiento en balnearios no sólo tiene un efecto psicológico; las sales contenidas en estas aguas poseen un efecto directo en las estructuras de la piel, son absorbidas en cierta medida y actúan sistémicamente. Se ha observado que la actividad terapéutica del fango térmico maduro se debe a un compuesto antiinflamatorio, un sulfoglicolípido producido mediante la colonización de microorganismos durante el proceso de maduración [14-15]. Además la fangoterapia influye en muchos procesos bioquímicos del organismo [15] y es capaz de mejorar las defensas antioxidantes séricas [16].

En nuestro estudio se obtuvo una efectiva estimulación en el tamaño de las glándulas sebáceas realizada a través de la administración intramuscular de testosterona propionato, resultando un incremento altamente significativo (p<0,01) de la talla de las glándulas sebáceas en el grupo estimulado. El tratamiento aplicado con las cuatro cremas de agua y fango mineral produjo una inhibición altamente significativa (p<0,01) del tamaño de las glándulas sebáceas respecto al grupo estimulado androgénicamente. El efecto obtenido fue sistémico, evidenciado por la semejanza del tamaño de las glándulas sebáceas entre las orejas tratadas con las cremas y las no tratadas y no se apreciaron diferencias entre las dos dosis aplicadas para cada crema. Esto nos demuestra la absorción de las sales y componentes activos de las aguas y fangos que se produjo durante el tratamiento aplicado.

Aunque la extrapolación de resultados obtenidos en animales para el empleo en humanos no refleja datos exactos, sí nos brinda una idea de la seguridad y efectividad de una nueva formulación para el tratamiento clínico. En nuestro

estudio, siguiendo una metodología descrita por el Prof. Dr. Sc. Do Trung Dàm, Jefe de Departamento de Farmacología y Bioquímica del Instituto de Materia Médica, Hanoi, Viet Nam (comunicación personal), encontramos que las dosis de 1,14 g y 5,72 g no deberían causar efectos irritantes significativos sobre los ojos y la piel respectivamente en humanos y sería necesaria la aplicación de 2,2 g de crema extendida sobre la piel para obtener el efecto farmacológico observado en animales. Nótese que la dosis obtenida del ensayo de irritación ocular se refiere a exposición accidental ya que estas cremas no serán utilizadas sobre las estructuras oculares.

Los remedios naturales resultan promisorios en el tratamiento de una amplia variedad de desórdenes dermatológicos que incluyen la inflamación, fototoxicidad, psoriasis, dermatitis atópica y alopecia aerata [2,17]. El efecto de sales en la piel no sólo se debe a efectos físicos sino que también puede ser el resultado de la penetración de los minerales en el cuerpo a través de la piel, produciendo acciones definidas sobre las células [3-4]. A través de diferentes estudios se ha demostrado la efectividad de las sales en el tratamiento de psoriasis [2,18], además la terapia con agua mineral aumenta la motilidad intestinal [19], es útil en la prevención de la aparición de piedras de oxalato de calcio y ácido úrico [20] e inhibe la secreción de hormona paratiroidea y la resorción ósea [21].

El incremento de la secreción sebácea es uno de los factores de la patogénesis del *acne vulgaris*, el cual es inducido por la unión de la dihidrotestosterona a receptores androgénicos en la piel [6]. Por consiguiente, el efecto antiandrogénico de agentes terapéuticos sobre las glándulas sebáceas estimuladas con testosterona resultan ser efectivos en la terapia del acné. En nuestro estudio obtuvimos que el tratamiento tópico con las cuatro cremas de agua y fango mineral fue capaz de producir un efecto sistémico, inhibiendo significativamente ($p < 0,01$) el tamaño de las glándulas sebáceas en oreja de hámster estimulados androgénicamente. Además las cuatro formulaciones resultaron no irritante en ojo y piel y no fototóxicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sukenik, S., D. Flusser & M. Abu-Shakia (1999) *Dis. Clin. North. Am.* **25**: 883 - 97.
2. Ozcelik, S., H.H. Polat, M. Akyol, A.N. Yalcin, D. Ozcelik & M. Marufihah (2000) *J. Dermatol.* **27**: 386-90.
3. Hercogova, J., E. Stanghellini, E. Tsoureli-Nikita & G. Menchini (2002) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **16**: 263-6.
4. Yoshizawa, Y., K. Kitamura S. Kawana & H.I. Maibach (2003) *Skin Res. Technol.* **9**: 31-3.
5. Titzmann, T. & B.R. Balda (1996) *Clin. Dermatol.* **14**: 611-3.
6. Taisuke, S., T. Takashi & M. Masaaki,(1995) *J. Dermatol.* **22**: 233-7.
7. OECD Nº 405 (2002) *Guideline for testing of chemical. Acute eye irritation / corrosion.*
8. García, G., M. Palacios, R. Gazapo & L. Pérez (1988) *Rev. Cubana Farm.* **22**: 5-24.
9. OECD Nº 404 (2002) *Guideline for testing chemical. Acute dermal Irritation / corrosion.*
10. ISO 10993 (2000) *Biological Evaluation of Medical Devices.* Part. 10. Test for irritation and sensitization. 8-13.
11. Nilsson, R., T. Maurer & N. Redmond (1993) *Contact Dermatitis* **28**: 285-90.
12. Andreassi, L. & L. Flori (1996) *Clin. Dermatol.* **14**: 627-32.
13. Bellometti, S. Cecchettin, M., Galzigna, L. (1997) *Clin. Chim. Acta.* **268**: 101-6.
14. Cecchettin, M., S. Bellometti, A. Lalli & L. Galzigna (1995) *Phys. Rheabil. Kur. Med.* **5**: 92-3.
15. Galzigna, L., C. Moretto & A. Lalli (1996) *Biomed. Pharmacother.* **50**: 306-8.
16. Bellometti, S., M. Cecchettin, A. Lalli & L. Galzigna (1996) *Biomed. Pharmacother.* **6**: 50-7.
17. Levin, C. & H. Maibach (2002) *Arch. Dermatol.* **138**: 207-11.
18. Tsoureli-Nikita, E., G. Menchini, I. Ghersetich & J. Hercogova (2002) *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **16**: 260-2.
19. Evandri, M.G. & P. Bolle (2001) *Farmaco* **56**: 475-82.
20. Kessler, T. & A. Hesse (2000) *Br. J. Nutr. Dec.* **84**: 865-71.
21. Guillemant, J., H.T. Le, C. Accarie, S.T. du Montcel, A.M. Delabroise, M.J. Arnaud & S. Guillemant (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 999-1002.