

UNIDAD DE ENSAYOS TOXICO-BIOLÓGICOS

**ENSAYO DE LA IRRITACION  
DE LA PIEL (3)**

CUMPLIENDO LAS NORMATIVAS DE SUSTANCIAS Y PREPARADOS PELIGROSOS

**Empresa: INDUSTRIAS MASATS**

**Prod./Muestra: TIZAS ALPINO**

**Lote/Referencia: -**

**Nº Petición: D02257568**

CONFIDENCIAL

ENSAYO DE LA IRRITACION EN LA PIEL (3) CUMPLIENDO LAS NORMATIVAS DE  
SUSTANCIAS Y PREPARADOS PELIGROSOS

1.- METODO

2.- RESUMEN DEL METODO

3.- MUESTRA

4.- LOCALIZACION DEL ESTUDIO

5.- MATERIAL

6.- CONDICIONES AMBIENTALES

7.- PREPARACION DE LOS ANIMALES

8.- PREPARACION DE LA MUESTRA

9.- ENSAYO

10.- PARAMETROS ESTUDIADOS Y CRITERIOS DE VALORACION

11.- TABLAS DE RESULTADOS

12.- BIBLIOGRAFIA

13.- CONCLUSIONES

## 1.- METODO

- El método empleado en el ensayo es el descrito en el REAL DECRETO 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas.

- Todo ello en cumplimiento del Real Decreto 255/2003, de 28 de febrero, por el que se aprueba el "Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos".

## 2.- RESUMEN DEL METODO

Este ensayo pretende evaluar el potencial de la muestra estudiada para producir corrosión o irritación en la piel. Se realiza en tres conejos porque no hay sospecha de que el producto pueda ser corrosivo.

Se aplica la muestra en una dosis única, sobre la piel rasurada de varios conejos, siendo cada uno de ellos su propio testigo. Se observa la importancia de la reacción de irritación y se valora después de unos periodos de tiempo determinados. Se hace una descripción detallada de las alteraciones con el fin de permitir una evaluación completa de los efectos. Se evalúa el carácter reversible de los efectos observados. Se hace una valoración de los resultados y se obtienen unas conclusiones.

### 3.- MUESTRA OBJETO DEL ESTUDIO

Muestra: TIZAS ALPINO

Lote / Referencia: -

Nº de petición: D02257568

### 4.- LOCALIZACION DEL ESTUDIO

El presente estudio se ha realizado en la Unidad de Ensayos Toxicológico-Biológicos de Laboratorio de análisis Dr. Echevarne, situada en el Camí de Ca la Madrona, 29 del Polígono Industrial Mata-Rocafonda de Mataró (Barcelona).

### 5.- MATERIAL

- .- Animales: 3 conejos machos, de raza Neozelandesa blanca, suministrados por un proveedor autorizado.
- Balanza para pesar los animales (COBOS D 6000-SX).
- .- Guantes de vinilo o de látex de un solo uso.
- .- Jeringas de 1 mL (tipo insulina).
- .- Carro de transporte con ruedas.
- .- Máquina de rasurar eléctrica AESCULAP mod. Favorita II provista de cuchilla nº GT 730.
- .- Apósitos tipo gasa (Melolin) o equivalente autorizado.
- .- Esparadrapo.
- .- Vendaje adhesivo hipoalergénico (Fixomull Seretch) o equivalente autorizado.

## 6.- CONDICIONES AMBIENTALES

Durante la aclimatación-cuarentena y el ensayo, las condiciones ambientales de estabulación fueron las siguientes:

Temperatura: 21°C ( $\pm$  2°C).

Humedad Relativa: 55% ( $\pm$  25%).

Aire: 15 renovaciones de aire por hora y prefiltrado de 5  $\mu$ m.

Iluminación: Ritmo circadiano de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, reguladas mediante temporizadores.

Alojamiento: Jaula individual de acero inoxidable, marca Tecniplast.

Alimentación: dosis diaria de 150g de dieta especial para conejos de experimentación, suministrada por un proveedor autorizado.

Bebida: Automática *ad libitum*, tratada y filtrada a 5 $\mu$ m.

Limpieza: Automática.

## 7.- PREPARACION DE LOS ANIMALES

### 7-1.- CONTROL E IDENTIFICACION INDIVIDUAL

Los conejos son identificados por el proveedor con una placa metálica (con un número gravado) insertada en la parte media de la oreja derecha. Una vez los animales llegan a la unidad se verifica la identificación, se someten a un control sanitario y se registra su llegada.

### 7-2.- ACLIMATACION - CUARENTENA

Los animales fueron observados diariamente, durante un periodo de aclimatación – cuarentena de 5 días, que superaron sin ninguna observación significativa, mereciendo especial atención el buen estado de la piel y el pelo.

### 7-3.- PREPARACION PARA EL ENSAYO

El rasurado de los conejos se efectuó a nivel de la región dorsal retro-escapular en la zona cercana a la columna vertebral, formando un rectángulo de 20 cm de largo y 13 cm de ancho.

## 8.- PREPARACION DE LA MUESTRA

Se aplicó la muestra remitida sin necesidad de preparación.

## 9.- ENSAYO DE IRRITACION DE LA PIEL

Una vez rasurado los conejos, se aplica la muestra sobre una superficie de la piel de unos 6 cm<sup>2</sup> y se cubre con un apósito, se sujeta mediante un esparadrapo y se recubre a su vez con un suave vendaje adhesivo hipoalergénico.

Si se trata de muestras sólidas, se aplican 0,5 g, humedeciendo suficientemente con agua (o vehículo apropiado) para asegurar el buen contacto con la piel o si es necesario se realizan recortes de muestra de 2,5 cm x 2,5 cm.

Si se trata de muestras líquidas o pastosas, se extienden primero 0,5 mL sobre el apósito y posteriormente se aplica éste sobre la piel.

El periodo de exposición total de la muestra es de 4 horas en los 3 conejos. Dado que hay sospecha de que el producto puede ser corrosivo, en uno de los conejos, se levanta el apósito tras 3 minutos de exposición, para evaluar posibles lesiones en profundidad. Al no observarse lesiones se vuelve a aplicar y se levanta al cabo de 1 hora de la aplicación en que no se observa ninguna lesión. Se vuelve a aplicar y se mantiene hasta transcurridas las 4 horas.

Transcurrido el periodo de exposición se elimina suavemente la sustancia ensayada con agua o disolvente apropiado.

## 10.- PARAMETROS ESTUDIADOS Y CRITERIOS DE VALORACION

### 10-1.- CONTROL DE PESO

Se efectúa al principio del ensayo.

### 10-2.- EXAMEN GENERAL

Se observa el estado general del animal y el estado de la piel, merece especial atención la aparición de modificaciones en la zona tratada, como corrosión, eritema y escarificación, edema o cualquier otra alteración.

### 10-3.- LECTURA Y VALORACION DE LAS OBSERVACIONES

En cada tiempo de observación (1, 24, 48 i 72 horas después de levantar los apósitos), se anotan las alteraciones de la zona tratada, según el criterio siguiente:

- Corrosión: Existe una destrucción del tejido en todo el espesor de la piel.
- Eritema y edema: ver siguiente apartado



<u>Eritema y escarificación</u>	<u>Valor</u>
Sin eritema	0
Eritema muy ligero (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (color rojo violáceo) con formación de escaras (lesión en profundidad)	4

<u>Formación del edema</u>	<u>Valor</u>
Sin edema	0
Edema muy ligero (apenas perceptible)	1
Edema ligero (contorno de la zona edematosa bien definido por una elevación neta)	2
Edema moderado (elevación de aproximadamente 1mm)	3
Edema grave (elevación de más de 1 mm que se extiende más allá de la región expuesta)	4

Si no hay reversión de las lesiones en las primeras 72h, pueden ser necesarias otras observaciones, hasta un máximo de 14 días.

#### 10-4.- CRITERIOS DE VALORACION DE LOS RESULTADOS

Según el Real Decreto 363/1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Publicado en el BOE nº133 de lunes 5 de junio de 1995:

- Sustancias y preparados corrosivos:

*Se considera que una sustancia o un preparado son corrosivos si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, destruyen los tejidos en todo el espesor de la piel de por lo menos un animal, durante el ensayo de irritación cutánea descrito.*

*Las sustancias o preparados se clasificarán como “corrosivos” y se les asignará el símbolo “C” y la indicación de peligro, “corrosivo”. Se les asignarán frases de riesgo según los criterios siguientes:*

**R35 Provoca quemaduras graves**

*-Si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, producen lesiones en los tejidos en todo el espesor de la piel después de un tiempo de exposición que no sobrepase los 3 minutos, o si dicho resultado fuera previsible.*

**R34 Provoca quemaduras**

*-Si, al aplicarlos sobre la piel intacta y sana de un animal, producen lesiones en los tejidos en todo el espesor de la piel después de un tiempo de exposición que no sobrepase las 4 horas, o si dicho resultado fuera previsible.*

- Sustancias y preparados irritantes:

Las sustancias y preparados se clasificarán como “irritantes” y se les asignará el símbolo “Xi” y la indicación de peligro “irritante”, según los criterios siguientes:

Inflamación de la piel

Se asignarán las siguientes frases de riesgo conforme a los criterios :

**R38 Irrita la piel**

- Sustancias y preparados que produzcan una inflamación importante de la piel, la cual persista al menos 24h tras un periodo de exposición que no sobrepase las cuatro horas, cuando se realiza la determinación con el conejo según el método de ensayo de irritación cutánea descrito.

La inflamación de la piel se considerará importante si:

- el valor medio de los resultados de la formación de eritemas y escaras o bien el edema (valor calculado teniendo en cuenta todos los animales de ensayo) es igual o superior a 2.

- o bien, en caso de que el ensayo se hubiera realizado en tres animales, cuando se haya observado en dos o más animales la formación de eritemas y escaras o de edemas equivalentes a un valor medio igual o superior a 2, calculado por cada animal individualmente.

En ambos casos, al calcular los respectivos valores medios deberán utilizarse todos los resultados de cada uno de los periodos de lectura (24, 48 y 72 horas) para cada efecto.

La inflamación de la piel también se considerará importante si persiste en un mínimo de dos animales, al final del periodo de observación. También deberán tenerse en cuenta efectos especiales como por ejemplo, hiperplasia, descamación, decoloración, formación de fisuras o costras o alopecia.

11.- TABLAS DE RESULTADOS

## 11-1.- TABLA DE PESOS

CONEJO	PESO en gramos.
Nº 1	2362
Nº 2	2540
Nº 3	2350

## 11.2.- TABLAS DE LAS ALTERACIONES OBSERVADAS A 1, 24, 48 Y 72 HORAS.

TABLA DE VALORES DE ERITEMA Y EDEMA

		ERITEMA	EDEMA	CORROSION
CONEJO 1	1 horas	1	0	
	24 horas	1	0	
	48 horas	1	0	
	72 horas	0	0	
CONEJO 2	1 horas	1	0	
	24 horas	1	0	
	48 horas	0	0	
	72 horas	0	0	
CONEJO 3	1 horas	1	1	
	24 horas	0	0	
	48 horas	0	0	
	72 horas	0	0	

TABLA DE MEDIAS DE LOS VALORES DE ERITEMA Y EDEMA  
OBTENIDOS A LAS 24, 48 y 72 HORAS

	MEDIA ERITEMA	MEDIA EDEMA
CONEJO 1	0,67	0,00
CONEJO 2	0,33	0,00
CONEJO 3	0,00	0,00
TODOS	0,33	0,00

Observaciones: -

## 11.3.- TABLAS DE LAS ALTERACIONES OBSERVADAS A 7 Y A 14 DIAS.

		7 DIAS	14 DIAS
CONEJO N° 1	ERITEMA	-	-
	EDEMA	-	-
	CORROSION	-	-
CONEJO N° 2	ERITEMA	-	-
	EDEMA	-	-
	CORROSION	-	-
CONEJO N° 3	ERITEMA	-	-
	EDEMA	-	-
	CORROSION	-	-

Observaciones: -

## 12.-BIBLIOGRAFIA

- REAL DECRETO 363 /1995, de 10 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas.

- REAL DECRETO 255/2003, de 28 de febrero, por el que se aprueba el "Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos".

- DIRECTIVA Y ANEXO 92/69/CEE de la Comisión, de 31 de julio de 1992, por la que se adapta, por decimoséptima vez, al progreso técnico de Directiva 67/548/ CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de las sustancias peligrosas.

- DIRECTIVA 93/21/CEE y ANEXOS I, II, III y IV de la Comisión de 27 de abril de 1993, por la que se adapta por decimioctava vez al progreso técnico de la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas.

- DIRECTIVA 92/32/CEE del Consejo de 30 de abril de 1992 por la que se modifica por séptima vez la Directiva 67/0548/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales reglamentarias y administrativas, en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas.

- LINEAS DIRECTRICES para los Ensayos de Productos Químicos de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) nº 404: EFECTO IRRITANTE / CORROSIVO EN LA PIEL (puesta al día 17/07/92)

- JOHN W. DRAIZE y otros. Methodes for the Study of irritation and toxicity of sustances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic. 1994.

- DIRECTIVA 86/609 CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros al respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

- REAL DECRETO 22/1988 de 14 de marzo , sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos.

- LLEI 5/1995 de 21 de juny de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques ( DOGC 2073- 10.7.1.1995)

- DECRET 214 /1997 de 30 de juliol pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques (DOGC 2450 –7.8-1997).

### 13.CONCLUSIONES

Dado que en ninguno de los animales se observa un valor medio de eritema y escaras o edema igual o superior a 2 la muestra “ **TIZAS ALPINO** “ (D02257568) no produce inflamación de la piel. No será necesario asignar ninguna frase de riesgo de las descritas en el punto 10.4.- del presente informe.

Esta clasificación no excluye a cualquier otra que sea consecuencia de otros ensayos realizados.



Núria Alvarez i Genoher

Directora Unidad de Ensayos Tóxico-biológicos

Mataró 31 de octubre de 2008