

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de lotes de OLEOZON® tópico frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Epidermophyton floccosum*

Determination of the minimum inhibitory concentration of batches of topical OLEOZON® against trichophyton rubrum, trichophyton mentagrophytes and epidermophyton floccosum

Manuel Eduardo Cordero Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-1457-9717>

Carlos Fernández Andreu² <http://orcid.org/0000-0002-2306-0001>

Javier San Juan Galán² <https://orcid.org/0000-0001-5943-715X>

Mayda Perurena Lancha² <http://orcid.org/0000-0002-5255-9012>

Gerardo Martínez Machín² <http://orcid.org/0000-0002-7388-0374>

Rosario Velar Martínez² <https://orcid.org/0000-0001-9507-0578>

María Ilnait Zaragoza² <https://orcid.org/0000-0002-8929-6172>

Gonzalo Cima Sotolongo¹ <http://orcid.org/0000-0001-8015-1674>

Oscar Ledea Lozano¹ <http://orcid.org/0000-0001-8521-2747>

Lidia Asela Fernández García¹ <http://orcid.org/0000-0002-1043-5505>

Irán Fernández Torres¹ <http://orcid.org/0000-0002-0780-7988>

¹Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Grupo de Productos Ozonizados. La Habana, Cuba.

²Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: manuel.cordero@cnic.cu

RESUMEN

Introducción: En la actualidad las infecciones por hongos afectan entre el 20 y el 25 % de la población.

Objetivo: Determinar la concentración mínima inhibitoria de dos lotes de OLEOZON® almacenados a temperaturas de 5 y 30°C en envases de vidrio y polietileno de alta densidad, durante 24 meses como parte del estudio de estabilidad del OLEOZON® tópico.

Métodos: Mediante el método dilución en agar fueron evaluadas cinco concentraciones del producto frente a los dermatofitos trichophyton rubrum, trichophyton mentagrophytes y epidermophyton floccosum.

Resultados: Se obtuvo que el 8,9 mg/mL fue el valor de la CMI para las cepas evaluadas en el estudio “vida de estante”; se observó en el estudio acelerado el mismo valor frente a las cepas de trichophyton mientras que para epidermophyton floccosum fue de 17,8 mg/mL a excepción del envase frasco de vidrio del lote 803295 donde se obtuvo 8,9 mg/mL. El análisis estadístico, tanto del estudio acelerado como en vida de estante, mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre el primer y el último mes de ensayo, estas son las diferencias más apreciables en los lotes almacenados en frasco de vidrio. El OLEOZON®

tópico almacenado en frasco de polietileno de alta densidad presentó mejores valores de actividad frente a los dermatofitos.

Conclusiones: Todos los valores de la concentración mínima inhibitoria encontrados, independiente del tipo de envase, el tiempo o la temperatura de almacenamiento, muestran que el producto mantiene su actividad antifúngica. Se evidenció una similitud entre las cepas del género *trichophyton* en comparación con el género *epidermophyton*.

Palabras clave: dermatofitos; OLEOZON® tópico; concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

Introduction: Currently fungal infections affect between 20 and 25% of the population.

Objective: To determine the minimum inhibitory concentration of two batches of OLEOZON® stored at temperatures of 5 and 30 °C in glass and high-density polyethylene containers, for 24 months as part of the stability study of topical OLEOZON®.

Methods: Using the agar dilution method, five concentrations of the product were evaluated against the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Epidermophyton floccosum*.

Results: It was found that 8.9 mg/mL was the MIC value for the strains evaluated in this shelf life study; and the same value was observed in the accelerated study against the *trichophyton* strains, while for *epidermophyton floccosum* it was 17.8 mg/mL with the exception of the glass bottle container of batch 803295 where 8.9 mg/mL was obtained. The statistical analysis, both in the accelerated study and in shelf life, showed that there is a statistically significant difference between the first and the last month of the trial, these are the most appreciable differences in the batches stored in glass jars. Topical OLEOZON® stored in a high-density polyethylene bottle presented better activity values against dermatophytes.

Conclusions: All the values of the minimum inhibitory concentration found, regardless of the type of container, the time or the storage temperature, show that the product maintains its antifungal activity during the months of study. A similarity was apparent between the strains of the genus *trichophyton* compared to the genus *epidermophyton*.

Keywords: dermatophytes; OLEOZON® topical; minimum inhibitory concentration.

Recibido: 07/09/2022

Aceptado: 08/09/2022

Introducción

Actualmente las infecciones por hongos afectan del 20 al 25 % de la población mundial,⁽¹⁾ entre ellas las producidas por hongos dermatofitos representan entre un 5 y 10 %.⁽²⁾ Los dermatofitos son un grupo de hongos con capacidad para adherirse a la queratina y degradarla lo que les permite colonizar tejidos queratinizados como estrato córneo, pelos y uñas.⁽³⁾

Los dermatofitos se clasifican en tres géneros: *Epidermophyton*, *microsporum* y *Trichophyton*. Se reconocen más de 40 especies, alrededor de una docena son patógenas para el hombre. El género *epidermophyton* tiene dos especies conocidas, donde *Epidermophyton*.

floccosum representa y constituye la única patógena para el hombre y la especie tipo, mientras que el género *microsporium* presenta como la especie tipo a *M. audouinii* y posee unas 20 especies distintas, de las que unas 10 son patógenas para el hombre.⁽⁴⁾ El género *trichophyton* es el más frecuente con cerca de 30 especies, de las que menos de 10 son responsables de las dermatofitosis humanas,⁽⁴⁾ con una prevalencia del 70-90 % para onicomicosis y 53-86 % para el resto de infecciones de tiña,⁽⁵⁾ *T. tonsurans* constituye la especie tipo,⁽⁴⁾ mientras que *Trichophyton rubrum* es el principal agente etiológico seguido por *T. mentagrophytes*.^(6,7)

Las opciones de tratamientos para estas enfermedades son numerosas y varían no solo de acuerdo al tipo de microorganismos sino también al país o región donde se indique el tratamiento. Históricamente, los imidazoles como el bifonazol, clotrimazol, miconazol han sido los de mayor uso para el tratamiento de las micosis cutáneas y en los últimos años se incorporan los triazoles como el fluconazol, itraconazol y efinaconazol.⁽⁸⁾ Por otro lado, las alilaminas como la butenafina, naftifina y la terbinafina provocan la disminución de la producción de ergosterol en la etapa temprana de su formación lo que provoca una disminución en la organización celular y el crecimiento del hongo.⁽⁹⁾

La resistencia a los antifúngicos presenta implicaciones importantes en la morbilidad y la mortalidad de las micosis; las consecuencias clínicas de esta resistencia se observan en los fallos en el tratamiento y en los cambios en la prevalencia de las especies fúngicas.^(10,11) De ahí que, constituye una necesidad el desarrollo de estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces que eviten los problemas que aparecen en la actualidad con las micosis por hongos resistentes.

El aceite de girasol ozonizado OLEOZON® es un medicamento desarrollado y producido en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Es un antimicrobiano de amplio espectro, que resulta letal para numerosas especies de bacterias, hongos filamentosos y levaduras por lo que se emplea exitosamente en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas.^(12,13,14) El mecanismo de acción de los aceites ozonizados sobre los microorganismos no está completamente dilucidado. No obstante, es generalmente aceptado que la actividad antimicrobiana de los aceites vegetales ozonizados está relacionada con la acción de los compuestos peroxídicos, formados por la reacción del ozono con los ácidos grasos insaturados que componen los aceites vegetales. Entre los principales blancos de los peróxidos en los microorganismos se encuentran los lípidos insaturados y las proteínas que contienen los grupos sulfidrilos.⁽¹⁵⁾

El OLEOZON® es un medicamento registrado para el uso en la epidermofitosis desde el año 1999,⁽¹⁶⁾ y a partir de esa fecha existen numerosas renovaciones de registros de acuerdo a las exigencias presentadas por la autoridad regulatoria Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).^(17,18) Uno de los ensayos exigidos para el registro de los medicamentos es el estudio de estabilidad, donde no solo se analiza la estabilidad químicamente, sino también la actividad antimicrobiana y se tienen en cuenta la temperatura: estudio acelerado ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) y estudio vida de estante ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) así como el tipo de envase.⁽¹⁹⁾

Esta investigación tuvo el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria de dos lotes de OLEOZON®, tópicos almacenados a dos temperaturas y en dos tipos de envases: de vidrio (FV) y polietileno de alta densidad (FPAD), frente a tres cepas de dermatofitos.

Métodos

En el estudio se emplearon dos lotes de OLEOZON®, lotes 803295 y 803301, proporcionados por el CNIC, los cuales fueron almacenados en FV y FPAD y a dos temperaturas, 25 ± 2 °C donde se tomaron muestras al inicio, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses y de 5 ± 3 °C donde se tomaron muestras al inicio; 1, 3, 6, 9, 12, 15, 21 y 24 meses.⁽¹⁹⁾

Cepas fúngicas

Las cepas evaluadas fueron *Trichophyton rubrum* CBS 218,65; *Epidermophyton floccosum* var. *Floccosum* CBS 240,67 y *Trichophyton mentagrophytes* CBS 572,75. Todas fueron conservadas en aceite mineral y en agua destilada estéril.

Preparación del antifúngico

Se preparó una emulsión en proporción 3:2:3 con OLEOZON® (950 mg/mL), Tween 80 y caldo Müeller-Hinton, con lo cual el principio activo quedó a una concentración de 356,25 mg/mL. Una vez estabilizada la mezcla se colocó en un equipo ultrasónico durante 15 min.

Se realizaron diluciones colocaron concentraciones decrecientes de OLEOZON® en Erlenmeyers que contenían 25 mL de agar Müeller-Hinton esterilizado, finalmente el producto quedó en concentraciones de 36,5 mg/mL; 17,8 mg/mL; 8,9 mg/mL; 4,45 mg/mL; 2,25 mg/mL; y luego se distribuyeron en placas Petri hasta su completa solidificación a temperatura ambiente.

Preparación de los medios de cultivo y del inóculo

Con la ayuda de una aguja de inoculación, se transfirió una porción de cada cepa a tubos de agar dextrosa Sabouraud y papa dextrosa, los que se incubaron a 25 °C durante 7-14 días. Para confirmar la pureza e identificación de los hongos filamentosos se examinaron las características del cultivo a simple vista, y luego se observaron las colonias al anverso y reverso bajo estereoscopio (Carl Zeiss, Alemania), se realizó un examen directo del cultivo para observar las estructuras clásicas de fructificación.

Para el microcultivo se utilizó una placa Petri de vidrio esterilizada, cuyo fondo se encontraba cubierto con papel de filtro, sobre el cual se colocó una varilla de vidrio en forma de “V”, un cubreobjetos y un portaobjetos. Sobre este último se colocó una porción de agar papa dextrosa suplementado de 1 cm² de superficie, donde se inocularon fragmentos pequeños del aislado a identificar sobre la superficie de los bordes laterales. Después se cubrió el medio de cultivo con el cubreobjetos estéril y se incubó en cámara húmeda a 37°C. Una vez que se detectó el crecimiento del hongo se retiró el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos que contenía una gota de azul algodón de lactofenol. La preparación se observó al microscopio con aumento de 100X y 400X.

Las colonias fueron cubiertas con 1 mL de solución salina estéril al 0,85 % y con ayuda de un asa estéril se removió suavemente para liberar las conidias en la solución y obtener una suspensión turbia, formada por esporas y fragmentos de hifas. Después se tomó 1 mL de la suspensión y se transfirió a un tubo estéril y se homogenizó durante 15 seg con un vórtex (Heidolph, Alemania). Se esperó entre 3-5 min para que las partículas más densas sedimentaran y luego se tomó 1 mL de sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril. Luego se añadió una gota de tween 20 para disolver el inóculo y se procedió a colocar en la cámara de Neubauer una alícuota, y a realizar el conteo hasta ajustar la concentración final establecida

en un rango de $1,0-3,0 \times 10^5$ ufc/mL. La concentración del inóculo se verificó mediante la siembra de 100 μ L en agar Müeller-Hinton y se incubó a 25°C.

Posteriormente se realizaron diluciones 1:10 en medio caldo Müeller-Hinton hasta obtener una concentración final de $1-3 \times 10^3$ ufc/mL, que se empleó para inocular las placas con las diferentes diluciones del OLEOZON® previamente preparadas. Se estableció como control de esterilidad (agar Müeller-Hinton + OLEOZON®) para cada dilución y control de crecimiento (agar Müeller-Hinton + inóculo) con la concentración de inóculo final, para cada cepa.

Preparación e incubación de las muestras

Se distribuyó por extensión en la superficie del agar 100 μ L de la suspensión del inóculo ($1-3 \times 10^3$ ufc/mL) con ayuda de la espátula de Drigalski para lograr su distribución uniforme. Se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se incubó a 25 °C por 72 a 96 h. Se realizaron tres réplicas por cada dilución frente a cada cepa. La CMI fue considerada como la concentración más baja del OLEOZON® que, en condiciones in vitro definidas, impidió la aparición de crecimiento visible del microorganismo antes de transcurrido un período de tiempo definido.⁽²⁰⁾

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados a través del programa, *Statgraphics Centurion* versión 15,2. Se realizó el *test* de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos. Las demás pruebas empleadas fueron en dependencia del resultado del valor del estadístico W de Shapiro-Wilk. Para datos provenientes de una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas. Para los datos que no provienen de una distribución normal se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación entre dos muestras independientes, la prueba de Kruskal-Wallis para comparar varias muestras y la prueba de múltiples rangos para determinar la homogeneidad entre los grupos, se utilizó un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Se muestra los resultados del *test* de Shapiro-Wilk para el estudio acelerado y vida de estante. Se evidencia que los datos no provienen de una distribución normal (tabla 1).

Tabla 1-Valores del estadístico *p* del *test* de Shapiro-Wilk en el estudio acelerado y vida de estante

	<i>T. rubrum</i> 218		<i>T. mentagrophytes</i> 572		<i>E. floccosum</i> 240	
	FPAD	FV	FPAD	FV	FPAD	FV
Estudio acelerado						
Lote 803295	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,66 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$3,37 \times 10^{-5}$	$2,75 \times 10^{-9}$
Lote 803301	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$1,15 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-5}$	$3,83 \times 10^{-5}$	$4,69 \times 10^{-6}$
Estudio vida de estante						
Lote 803295	$1,25 \times 10^{-9}$	$1,25 \times 10^{-9}$	$1,25 \times 10^{-9}$	$1,25 \times 10^{-9}$	0,0	$1,61 \times 10^{-11}$
Lote 803301	$1,25 \times 10^{-9}$	$1,84 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^{-9}$	$1,84 \times 10^{-8}$	0,0	$6,81 \times 10^{-8}$

Se muestran los valores obtenidos de la CMI del estudio acelerado del lote 803295 en el tiempo y en los envases evaluados. Al analizar el comportamiento entre los FPAD y FV para cada microorganismo se evidenció la ausencia de diferencias significativas, para *T. rubrum* 218 P, *T. mentagrophytes* 572 y *E. floccosum* 240, los valores del estadístico de la prueba U de Mann-Whitney fueron 0,3; 0,99 y 0,29 respectivamente. Entre los valores de las concentraciones de los FPAD con relación a los tres microorganismos tampoco se evidenciaron diferencias significativas, el estadístico *p* de la prueba de Kruskal-Wallis resultó para los FPAD fue 0,84 y para los FV 0,13 (fig. 1).

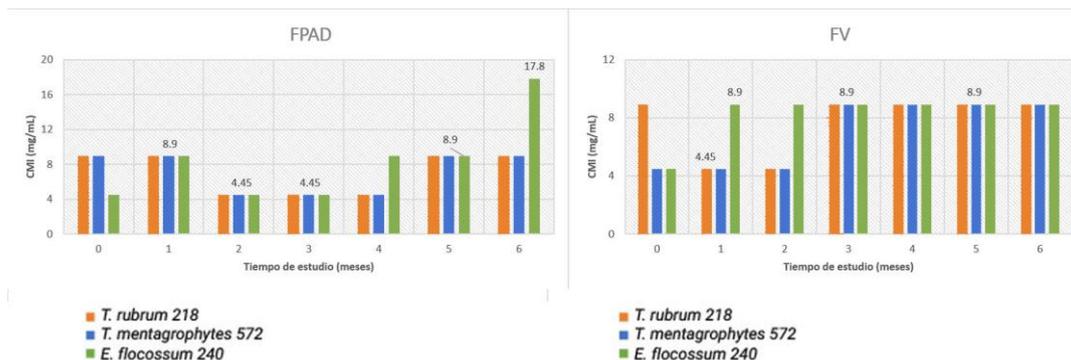


Fig 1- Valores de CMI para los dos envases en el tiempo del estudio acelerado del lote 803295

En cuanto a los resultados del lote 803301, los cuales se muestran en la figura 2, se observó similar comportamiento en relación al lote anterior. Resultó en ausencia de diferencias significativas entre los envases para cada microorganismo, para *T. rubrum* 218, *T. mentagrophytes* 572 y *E. floccosum* 240, los valores del estadístico de la prueba U de Mann-Whitney fueron 0,99; 0,71 y 0,14, respectivamente, así como para el mismo envase con relación a los tres dermatofitos. El valor del estadístico *p* de la prueba de Kruskal-Wallis resultó para los FPAD 0,25 y para los FV 0,91 (fig. 2).

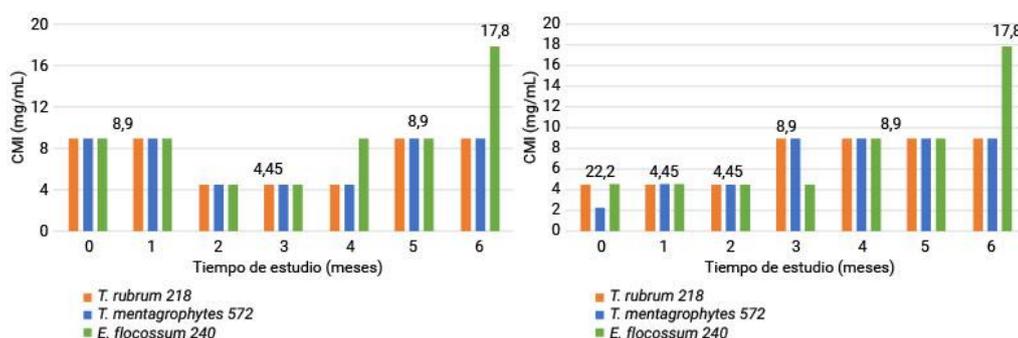


Fig 2- Valores de CMI para los dos envases en el tiempo del estudio acelerado del lote 803301.

Al analizar todos los valores obtenidos para los FPAD y para los FV entre los dos lotes no se evidenciaron diferencias significativas. El valor del estadístico p de la prueba de Kruskal-Wallis resultó ser 0,66 para el envase de plástico mientras que para el de vidrio fue 0,23. El análisis de los resultados de las CMI del estudio vida de estante del lote 803295 se muestran en la figura 3. El valor del estadístico p de la prueba U de Mann-Whitney al analizar el comportamiento entre los FPAD y FV para cada microorganismo evidenció la ausencia de diferencias significativas. Para *T. rubrum* 218 y *T. mentagrophytes* 572 fue 0,99 y para *E. floccossum* 240 0,08. Entre los valores de las concentraciones de los FPAD en relación a los tres microorganismos el valor del estadístico p de la prueba de Kruskal-Wallis resultó ser 0,03 lo que evidencia diferencias significativas entre los géneros estudiados. En cuanto a los FV se observó la existencia de grupos homogéneos ($p = 0,48$).

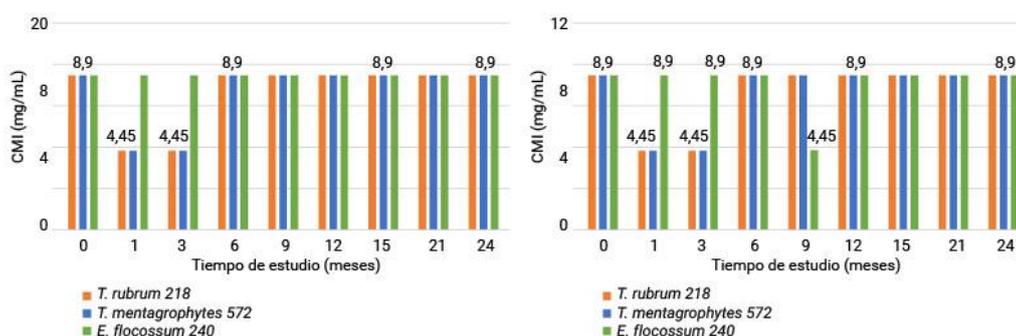


Fig 3- Valores de CMI para los dos envases en el tiempo del estudio vida de estante del lote 803295.

En la figura 4 se muestran los valores obtenidos de la CMI del lote 803301 del estudio vida de estante. En este lote se evidenciaron diferencias significativas entre los envases respecto a *E. floccossum* 240 ($p = 6,68 \times 10^{-6}$), contrario a las cepas de *Trichophyton*, donde el valor de p de la prueba U de Mann-Whitney fue 0,37 para ambas. Entre los valores de las concentraciones de los FPAD en relación a los tres microorganismos p resultó 0,03 lo que evidencia diferencias significativas entre los géneros estudiados. En cuanto a los FV se observó la existencia de grupos homogéneos ($p = 0,16$).

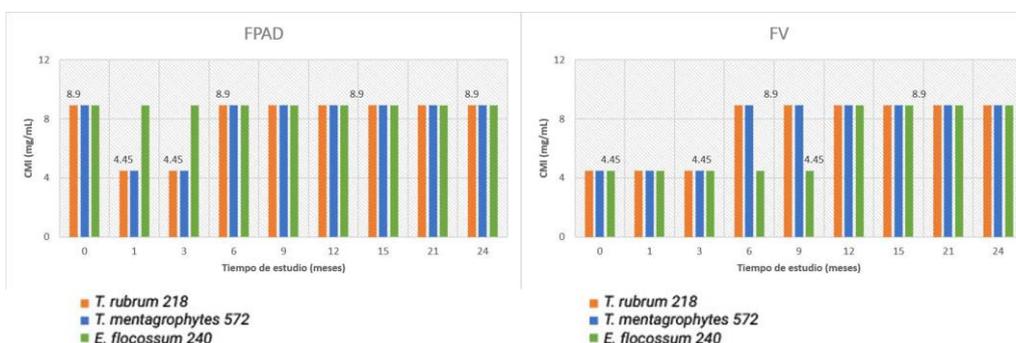


Fig 4- Valores de CMI para los dos envases en el tiempo del estudio vida de estante del lote 803301.

Al analizar los valores obtenidos para los FPAD entre ambos lotes se evidenciaron diferencias significativas entre los géneros en estudio. Se evidenció la formación de dos grupos homogéneos, uno para las especies del género *Trichophyton* y el otro para epidermophyton. En cuanto a los FV las diferencias fueron halladas entre los valores de *E. floccosum* 240 ($p = 6,23 \times 10^{-4}$) y entre los valores para los FV del lote 301 de *E. floccosum* 240 y los valores obtenidos para *T. rubrum* 218 y *T. mentagrophytes* 572 ($p = 0,01$).

Discusión

En la actualidad se conocen las propiedades generales de los aceites de girasol ozonizados, sus aplicaciones médicas, propiedades físico-químicas y sus propiedades antimicrobianas, lo que se evidencia en la existencia de estudios sobre la efectividad de estos aceites frente a las micosis en humanos. Sus efectos beneficiosos tanto por su acción antifúngica como antiinflamatoria, regenerativa y analgésica, falta de resistencia de los gérmenes, sus escasos o nulos efectos secundarios y toxicidad, al igual que su bajo coste en comparación a los antifúngicos convencionales, los convierten en fármacos ideales para las terapias actuales.⁽²¹⁾ El aceite ozonizado ha demostrado ser eficaz contra estafilococos, estreptococos y enterococos, pseudomonas, *Escherichia coli*, *mycobacterium* y se ha utilizado para curar infecciones fúngicas.⁽²²⁾

Los perfiles de susceptibilidad antifúngica no son los mismos en todas las regiones.^(23,24) En el método de susceptibilidad tanto el medio de cultivo, tamaño del inóculo, tiempo de incubación, entre otros, influyen directamente en los resultados, por lo que se consideran puntos críticos dentro de la metodología.^(25,26) Varios autores reportan los puntos de corte para la susceptibilidad antifúngica de dermatofitos frente a antifúngicos convencionales al utilizar la guía del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, y obtienen valores de CMI cercanos y dentro de los rangos establecidos en la guía, tanto en Latinoamérica,^(23,27) India,⁽²⁸⁾ e Irán.⁽²⁹⁾

En este estudio los valores finales de CMI oscilaron entre los 8,9-17,8 mg/mL, superiores en comparación con los datos obtenidos por *Ouf y otros*,⁽²²⁾ y *Geweely*,⁽³⁰⁾ los cuales utilizaron aceite de oliva ozonizado frente a dermatofitos, y lograron obtener valores que oscilaron entre 0,0001 - 0,0002 mg/mL,⁽²²⁾ y 0,5 - 2,0 mg/mL, respectivamente.⁽³⁰⁾ Las CMI de los aceites vegetales ozonizados se encuentran en el rango de 0,1 mg/mL a 10 mg/mL, que resultan al menos cien veces superiores a las que usualmente poseen los antimicrobianos convencionales. Estos valores relativamente elevados se deben a que la actividad biológica corresponde sólo a una fracción de los compuestos presentes en los aceites ozonizados, así como a la polimerización que sufren algunos compuestos peroxídicos durante el proceso de ozonización.⁽¹⁵⁾

Las diferencias encontradas entre los valores de CMI para los dos géneros estudiados, se atribuyen a la morfología que presentan. *E. floccosum* presenta macroconidios ampliamente claviformes con paredes celulares que van desde lo delgado a moderadamente gruesas, con presencia de uno a nueve septos. Mientras que el género *trichophyton* cuando están presentes los macroconidios, tienen paredes lisas, generalmente delgadas y de uno a 12 tabiques, se

pueden observar solos o en racimos, y pueden ser alargados y en forma de lápiz, claviforme, fusiforme o cilíndrica.⁽³¹⁾

El aumento de dichos valores de CMI puede estar asociado a la disminución del índice de peróxido del OLEOZON tópico. Preservar los aceites vegetales ozonizados y por tanto oxidados, es una difícil tarea, estos en general continúan rutas de descomposiciones muy difíciles de detener y controlar. Aunque el deterioro de los aceites puede provenir debido a la acción de enzimas o microorganismos, la oxidación es la causa más importante desde el punto de vista práctico. La luz, el calor y ciertas impurezas, tales como el agua y los metales, aceleran ese proceso. Se conoce que los peróxidos son los compuestos de descomposición primaria de la oxidación de las grasas y aceites, mientras que, en la reacción secundaria, los productos de descomposición que resultan de la oxidación son los peróxidos, aldehídos, ácidos.⁽³²⁾

Durante la ozonización de los aceites y su almacenamiento se observa la formación de ácidos libres tanto volátiles como no volátiles, lo que demuestra que tiene lugar la oxidación de una parte de los aldehídos con el ozono y el oxígeno molecular a un estado de oxidación superior, correspondiente a los ácidos grasos y una autooxidación de los hidroxil-hidroperóxidos. También durante el almacenamiento se observa una ligera disminución de la viscosidad, como consecuencia de la despolimerización de los poliperóxidos que se forman durante el proceso. Los compuestos formados entre el óxido de carbonilo y el compuesto prótico en el medio reaccionante, son capaces de autodeseccionarse, queda el aldehído y el hidroperóxido en equilibrio dinámico.⁽³³⁾ Estas reacciones en su conjunto provocan que los aceites vegetales ozonizados durante su almacenamiento modifiquen sus propiedades químicas, físicas y microbiológicas.⁽³²⁾

Se concluye que las concentraciones mínimas inhibitorias del OLEOZON® tópico obtenidas sugieren que este producto presenta una actividad antifúngica frente a los dermatofitos estudiados, independientemente del tipo de envase que lo contenga a lo largo del tiempo evaluado.

Referencias bibliográficas

1. Su H, Packeu A, Ahmed SA, Al-Hatmi AM, Blechert O, İlkit M, *et al.* Species distinction in the Trichophyton rubrum complex. *Journal of clinical microbiology*. 2019; 57: e00352-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00352-19>.
2. Ramos Bayas OE. Prevalencia de las micosis en los miembros superiores e inferiores de las personas que residen en la parroquia rural de Pinguilí Santo Domingo del Cantón Mocha. In. Universidad Técnica de Ambato-Facultad de Ciencias de la Salud-Carrera de Laboratorio Clínico 2020. [acceso 14/07/2022]. Disponible en <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30802>.
3. González GN, López EF, Bonafe JM. Tratamiento de las tiñas. FMC. Formación Médica Continuada en Atención Primaria. 2013;20:289-96. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1134-2072\(13\)70579-6](https://doi.org/10.1016/S1134-2072(13)70579-6).
4. De Diego, AM. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2011;29:33-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70025-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70025-8).

5. Dogra S, Shaw D, Rudramurthy SM. Antifungal drug susceptibility testing of dermatophytes: Laboratory findings to clinical implications. *Indian dermatology online journal*. 2019;10:225. DOI: https://doi.org/10.4103/idoj.IDOJ_146_19.
6. Yadav P, Singal A, Pandhi D, Das S. Clinico-mycological study of dermatophyte toenail onychomycosis in New Delhi, India. *Indian journal of dermatology*. 2015;60:153. DOI: <https://doi.org/10.4103/0019-5154.152511>.
7. Mayorga J, De León-Ramírez RM, Barrios-Marañón Y. Prevalence of dermatophytosis produced by *Trichophyton rubrum*. *Dermatología Revista Mexicana*. 2017 [acceso 15/07/2022];61:108-14. Disponible en: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/prevalencia-de-dermatofitosis-producidas-por-trichophyton-rubrum/>.
8. Panackal AA, Halpern EF, Watson AJ. Cutaneous fungal infections in the United States: analysis of the national ambulatory medical care survey (NAMCS) and national hospital ambulatory medical care survey (NHAMCS), 1995-2004. *International journal of dermatology*. 2009;48:704-12. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04025.x>.
9. Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems. 2013. [acceso 14/07/2022]. Disponible en: [Drugsafety/ucm362415.htm](https://www.fda.gov/drugsafety/ucm362415.htm).
10. Abdel-Rahman SM. Genetic Predictors of Susceptibility to Dermatophytosis. In *Dermatophytes and Dermatophytoses*. Springer. 2021;181-96. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-67421-2_9.
11. Lopes G, Pinto E, Salgueiro L. Natural products: an alternative to conventional therapy for dermatophytosis? *Mycopathologia*. 2017;182:143-67. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0081-9>.
12. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules* 2020;25:334. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25020334>.
13. Serio F, Pizzolante G, Cozzolino G, D'Alba M, Bagordo F, De Giorgi M, Grassi T, Idolo A, Guido M, De Donno A. A New Formulation Based on Ozonated Sunflower Seed Oil: *In Vitro* Antibacterial and Safety Evaluation. *Ozone. Science & Engineering*. 2017; 39:139-47. DOI: <https://doi.org/10.1080/01919512.2016.1272405>.
14. Gálvez BT, Hernández LL, Iglesias MP, Alonso GR, Crespo LÁ, Trujillo PM. Oleozon en el tratamiento de la gingivitis crónica edematosa y fibroedematosa. *Ozone Therapy Global Journal*. 2021 [acceso 15/07/2022];11:13-27. Disponible en: <http://xn--revistaespaoladeozonoterapia-7xc.es/index.php/reo/article/view/221>.
15. Curtiellas Piñol V. Los aceites ozonizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 2014 [acceso 15/07/2022] ;34:64-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2014/ei142e.pdf>.
16. Menéndez S, Molerio J, Díaz W, Lezcano I, León F, Ledea O, *et al*. Registro Sanitario Sobre la Aplicación del Aceite de Girasol Ozonizado OLEOZON en la Epidermofitosis.

- No.1498, Ciudad de La Habana, Cuba; 1999. [acceso 14/07/2022]. Disponible en: <https://www.cecmecmed.cu/registro/rcp/medicamentos/oleozonr-topico>.
17. Díaz M, Fernández H, Dennis P, Hernández R, Martínez G. Renovación del Registro sanitario OLEOZON ® Tópico. No. 1498,536/02.039;04M, Ciudad de La Habana, Cuba. 2004 y 2009.
18. Gómez MFD. Usos y propiedades de los aceites vegetales ozonizados. La experiencia cubana. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2010.[acceso 14/07/2022];41:1-12 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220509050>.
19. CECMED. No 23 R. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. MINSAP. Cuba. 2000:5-22. [acceso14/07/2022]. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/Reg_23-00.pdf.
20. Delgado Valverde MM. Impacto de la concentración mínima inhibitoria (cmi) y de los puntos de corte clínicos (clsi y eucast) de las combinaciones betalactámicos/inhibidores de betalactamasas en el pronóstico de bacteriemias por enterobacteriaceae. 2017.[acceso 14/07/2022]. Disponible en: https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/73670/Tesis_doctoral_Mercedes_Delgado_Valverde.pdf.
21. Delgado MÁ. Eficacia terapéutica del aceite de girasol ozonizado frente a la infección por *Malassezia pachydermatis* en perros y gatos. Ozone Therapy Global Journal. 2015 [acceso 14/07/2022];5:55-74. Disponible en: <http://www.xn--revistaespaoladeozonoterapia-7xc.es/index.php/reo/article/view/71>.
22. Ouf SA, Moussa TA, Abd-Elmegeed AM, Eltahlawy SR. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. Brazilian Journal of Microbiology. 2016;47:697-702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.014>.
23. Plaza-Trujillo P, López-Cisneros C-L. Evaluación de la susceptibilidad antifúngica in vitro de *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*. Maskana. 2021;12:65-70. DOI: <https://doi.org/10.18537/mskn.12.02.07>.
24. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal susceptibility testing: current approaches. Clinical Microbiology Reviews. 2020;33:e00069-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-19>.
25. Poojary S, Miskeen A, Bagadia J, Jaiswal S, Uppuluri P. A study of In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophytic fungi at a tertiary care center in Western India. Indian journal of dermatology. 2019;64:277. DOI: https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_456_18.
26. Méndez CC, Sánchez EG, Martín-Mazuelos E. Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2019;37:32-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(19\)30180-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(19)30180-6).
27. Díaz Jarabrán MC, Díaz González P, Espinoza Rodríguez J, Carrillo Muñoz AJ. Evaluación del perfil de sensibilidad in vitro de aislamientos clínicos de *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* en Santiago, Chile. Revista Iberoamericana de Micología. 2015;32:83-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.12.002>.
28. Maurya VK, Kachhwaha D, Bora A, Khatri PK, Rathore L. Determination of antifungal minimum inhibitory concentration and its clinical correlation among treatment failure cases of

dermatophytosis. Journal of Family Medicine and Primary Care. 2019;8:2577. DOI: https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_483_19.

29. Salehi Z, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2018;37:1841-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3317-4>.

30. Geweely NS. Antifungal activity of ozonized olive oil (Oleozone). Int J Agri Biol. 2006;8:671-8.

31. Mattei AS, Beber MA, Madrid IM. Dermatophytosis in small animals. SOJ Microbiol Infect Dis. 2014;2:1-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.15226/sojmid/2/3/00124>.

32. Martínez Sánchez G, Re L, Perez-Davison G, Horat Delaporte R. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. Ozone Therapy Global Journal. 2012. [acceso 17/07/2022];2:121-39. Disponible en: <http://xn--revistaespaoladeozonoterapia-7xc.es/index.php/reo/article/view/18>.

33. Schwartz A, Martinez-Sanchez G, Re L. Guía para el uso médico del ozono. Fundamentos terapéuticos e indicaciones. 2011 [acceso 17/07/2022]. AEPROMO. Disponible en: <https://aepromo.org/guia-para-el-uso-medico-del-ozono-version-online>.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Manuel Eduardo Cordero Hernández, Carlos Manuel Fernández Andreu, Oscar Ernesto Ledea Lozano, Lidia Asela Fernández García, Irán Fernández Torres.

Análisis formal: Manuel Eduardo Cordero Hernández, Gonzalo Cima Sotolongo.

Investigación: Manuel Eduardo Cordero Hernández, Irán Fernández Torres.

Metodología: Manuel Eduardo Cordero Hernández, Carlos Manuel Fernández Andreu, Javier Luis San Juan Galán, Mayda Perurena Lancha, Gerardo Martínez Machín, Rosario Esperanza Velar Martínez, María Teresa Ilnait, Irán Fernández Torres.

Validación: Manuel Eduardo Cordero Hernández, Irán Fernández Torres.

Visualización: Manuel Eduardo Cordero Hernández.

Redacción del borrador original: Manuel Eduardo Cordero Hernández.

Redacción, revisión y edición: Manuel Eduardo Cordero Hernández, María Teresa Ilnait, Gonzalo Cima Sotolongo, Oscar Ernesto Ledea Lozano, Lidia Asela Fernández García, Irán Fernández Torres.