

Actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite de girasol ozonizado sobre *Streptococcus mutans*

Irán Fernández Torres, Vicente Curtiellas Piñol y Elaine Sánchez Urrutia.

Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigaciones del Ozono, Avenida 15 y Calle 230, Siboney, Playa, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 2004. Aceptado: 30 de octubre de 2004.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, aceite ozonizado, OLEOZON®, concentración mínima inhibitoria.
Key words: *Streptococcus mutans*, ozonized oil, OLEOZON®, minimum inhibitory concentration.

RESUMEN. *Streptococcus mutans* es considerado como el principal agente etiológico de las caries bucales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto letal que ejerce el aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®) sobre este microorganismo. Se evaluó la influencia que presentan diferentes factores, como el pH, la concentración del agente antimicrobiano OLEOZON® y el tiempo de contacto. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias, las que presentaron un comportamiento similar entre especies del mismo género, no así con bacterias de otro género. Se demostró que la actividad del OLEOZON®, no variaba significativamente con las variaciones de pH estudiadas, aunque se obtuvo una ligera disminución en el número de microorganismos a pH ligeramente ácido, la cual fue mayor de un 99,9% del número inicial de microorganismo. El estudio de las distintas concentraciones reveló un efecto significativo sobre la letalidad del microorganismo, siendo la equivalente a 285 mg/mL, la de mayor efectividad. Con un tiempo de contacto de diez minutos entre el microorganismo y el agente, se logró una letalidad del 99,9 %, no así con el de tres minutos, con el cual se logró una reducción de hasta un 95 %, de la concentración inicial del microorganismo. Se obtuvo una ecuación, la cual relaciona los tres parámetros en estudio y que permitió examinar la influencia que ejercía el pH, la concentración del agente antimicrobiano y el tiempo en la muerte del microorganismo. Estos resultados demuestran que el OLEOZON® es un producto eficaz para el tratamiento de las infecciones provocadas por *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT *Streptococcus mutans* is considered the main ethiological agent of buccal caries. The aim of this work was to measure the lethality action of ozonized sunflower oil (OLEOZON®) on this microorganism. The influence of different conditions, like pH, agent concentration and contact time was evaluated. The values of minimum inhibitory concentration (CMI) were determined. The CMI shows similar behaviour among species of the same genus and different results for bacterias from other gender. It was proved that OLEOZON® activity did not vary significantly with the studied variation of pH, although the microorganism number decreases to pH lightly acid the highest decreased of initial microorganism concentration was about 99.9 %. The study of the influence of the different agent concentrations showed a significant effect of OLEOZON® in the microorganism lethality, being 285 mg/mL the most effective studied concentration. A ten-minute exposition time, between the agent and the microorganism, produces a 99.9 % of microorganism lethality; however with only three minutes of exposition time a reduction of 95.5 % of initial microorganism concentration was obtained. An equation which relates the study of three main physico-chemical parameters was obtained. This equation shows the influence of pH, antimicrobiological agent and exposition time upon of the inactivation of the microorganism. These results proved that OLEOZON® is an effective drug to treat *Streptococcus mutans* infection.

INTRODUCCION

Las enfermedades de la cavidad oral, en especial las caries, se consideran una de las pandemias que afecta entre el 40 y el 90 % de la población mundial.¹ Su principal agente causal, *Streptococcus mutans*, es un microorganismo que fermenta la glucosa con producción de ácido láctico, además, con la capacidad de producir dextranos extracelulares que actúan como mediadores en los mecanismos de fijación, favoreciendo el establecimiento de nichos en diferentes superficies como son, por ejemplo, los dientes y las válvulas cardíacas.^{2,3}

Streptococcus mutans puede ser considerado un patógeno de poca virulencia, aunque es agente causal de diversas enfermedades de gran repercusión sanitaria, como lo son las caries dentales, que sin ser mortal es una de las patologías más frecuentes a escala mundial, de costos muy elevados y una duración de por vida.⁴

Encontrar una vacuna con la capacidad de prevenir esta enfermedad, sería uno de los principales adelantos para liberar a la humanidad de una de las enfermedades infecciosas más importantes de los últimos tiempos. Sin embargo, por su complejidad, los investigadores continúan buscando alternativas efectivas y confiables para la erradicación de este mal.

El aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®) es un agente antimicrobiano de amplio espectro utilizado contra diversas afecciones. Una de sus aplicaciones más comunes es

contra las infecciones bucales tales como gingivoestomatitis herpética, gingivitis úlcero necrotizante entre otras.^{5,6}

El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad antimicrobiana del OLEOZON® bajo diferentes condiciones, tales como la concentración de aceite de girasol ozonizado, el tiempo de contacto y el pH frente a *Streptococcus mutans*.

MATERIALES Y METODOS

Cepa utilizada

Para la realización de las distintas pruebas, se utilizó la cepa *Streptococcus mutans* UTH 22, donada por el Instituto Carlos J. Finlay, Cuba.

Aceite de girasol ozonizado (OLEOZON®)

El aceite de girasol ozonizado fue producido en la planta de producción del Centro de Investigaciones del Ozono, Cuba.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La técnica se realizó por el método de dilución en agar, NCCLS 1999.⁷ Se prepararon placas Petri con agar triptona soya con aceite de girasol ozonizado a concentraciones que variaron desde 0,95 hasta 9,50 mg/mL (miligramos de aceite de girasol ozonizado por mililitro de medio de cultivo). Con el objetivo de lograr que el aceite de girasol ozonizado se disolviera de manera homogénea en el medio de cultivo, se añadieron 2 mL de Tween 80 por cada cien mililitros de medio de cultivo.

El medio se dejó solidificar en las placas y se mantuvo durante 24 h en reposo. Posteriormente, se adicionaron 2 µL del inóculo microbiano con lo que la concentración del microorganismo osciló entre $0,5 \cdot 10^3$ y $2,5 \cdot 10^3$ UFC/mL. Las placas se incubaron durante 24 h y se realizaron tres réplicas por cada determinación.

Establecimiento de la concentración de OLEOZON®, el tiempo de contacto y el pH empleado en este estudio

Se estudiaron tres concentraciones del agente antimicrobiano OLEOZON® (89, 178 y 285 mg/mL) las que fueron seleccionadas con el objetivo de lograr la mayor letalidad en el menor tiempo posible. La emulsión preparada a 285 mg/mL, es la mayor concentración a la cual el agente antimicrobiano se puede enfrentar al microorganismo, de acuerdo con las características de la técnica utilizada para su preparación.⁸

Se evaluaron tres valores de pH (6; 7 y 7,5), que abarcaron el intervalo en que se encuentra el pH bucal de cualquier individuo y se estudiaron tiempos de contactos de tres y diez minutos, que es el tiempo establecido de un lavado bucal después de cada comida.

Procedimiento

A partir de un cultivo fresco de *Streptococcus mutans* (de 16 a 18 h de incubación) en agar triptona soya, se tomaron de tres a cinco colonias, las que fueron inoculadas en tubos que contenían caldo Mueller-Hilton y se incubaron durante 18 h a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron y lavaron las células y el pellet fue resuspendido en 10 mL de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 0,05 mol/L a pH 6; 7 y 7,5, además, se realizaron diluciones 1 : 10 para obtener la concentración de microorganismos en el orden de $5,5 \cdot 10^7$ UFC/mL. Se adicionó 1 mL del microorganismo en tubos de ensayo que contenían igual volumen de aceite ozonizado, preparado 89, 178 y 285 mg/mL y se incubaron en zaranda rotatoria a 35 °C. Las muestras se tomaron a los tiempos establecidos de tres y diez minutos y de tubos de ensayos preparados de forma independiente para cada concentración de agente y cada pH.

Se realizaron diluciones seriadas para la siembra por profundidad de 0,1 mL en agar triptona soya y se incubaron las placas 24 h a 37 °C. Para el conteo de colonias se tomaron como confiables aquellas placas en las que crecieron de 10 a 250 colonias.

RESULTADOS Y DISCUSION

Concentración mínima inhibitoria

Se comparó la CMI de la cepa en estudio con las correspondientes a otras especies de *Streptococcus*, así con la de otras bacterias Gram+,

probadas previamente en el laboratorio^{8,9} (Tabla 1). Teniendo en cuenta que la CMI no es más que la mínima concentración a la cual el agente es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo se puede enjuiciar cuán efectivo es el agente antimicrobiano.

Los resultados indicaron un comportamiento similar de la CMI entre especies del género *Streptococcus*, sin embargo, en especies de otros géneros, este indicador aumenta hasta alcanzar 9,5 mg/mL.

Influencia de la concentración del OLEOZON®, el tiempo de contacto y el pH sobre la letalidad del microorganismo.

Se graficaron las variaciones del log N (número de sobrevivientes) a distintos pH, a las concentraciones estudiadas y los tiempos de contacto de tres y diez minutos (Figuras 1, 2 y 3). Uno de los objetivos de este trabajo fue el de establecer una concentración de OLEOZON® que fuese capaz de eliminar al menos un 99,9 % de los microorganismos que se encontraran inicialmente (reducción de hasta tres logaritmos) en el menor tiempo posible. Se pudo observar que un incremento en la concentración de OLEOZON® provoca un aumento en la muerte del microorganismo. A los tres minutos de contacto entre el OLEOZON® y *S. mutans* no se alcanza la reducción mínima requerida de un 99,9 % de los viables iniciales en los tres valores de pH estudiados y para la concentración de 89 mg/mL esta reducción se alcanza solo a pH 6 y 7. Los gráficos indican que a cualquiera de los tres pH, las concentraciones de 178 y 285 mg/mL garantizan una muerte superior al 99,9 % a los 10 min de contacto. En el caso de la concentración de 285 mg/mL de OLEOZON® esta reducción es superior al 99,99 %

Tabla 1. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de la cepa en estudio y otras cepas bacterianas.

Cepa	CMI (mg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i> UTH 22	2,37
<i>Streptococcus agalactiae</i> *	2,61
<i>Streptococcus uberis</i> *	2,14
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> *	2,37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	9,5
<i>Enterococcus durans</i> ATCC 19.432	9,5

* Aislamientos clínicos.

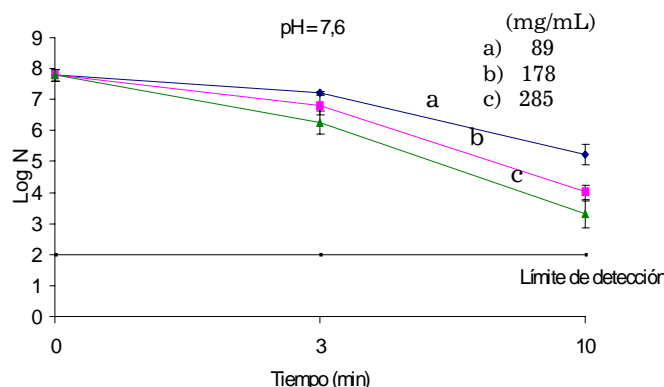


Fig. 1. Inactivación de *S. mutans* con OLEOZON® a pH 7,6.

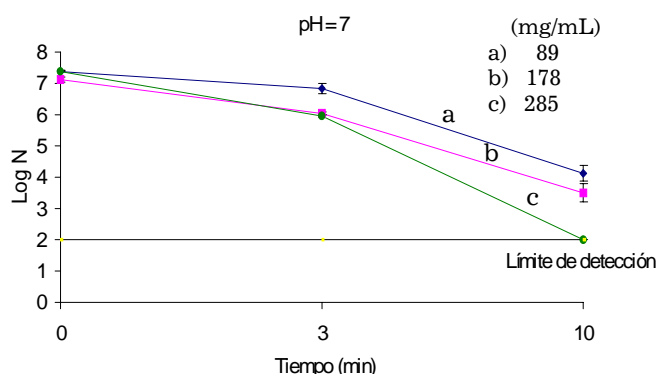


Fig. 2. Inactivación de *S. mutans* con OLEOZON® a pH 7.

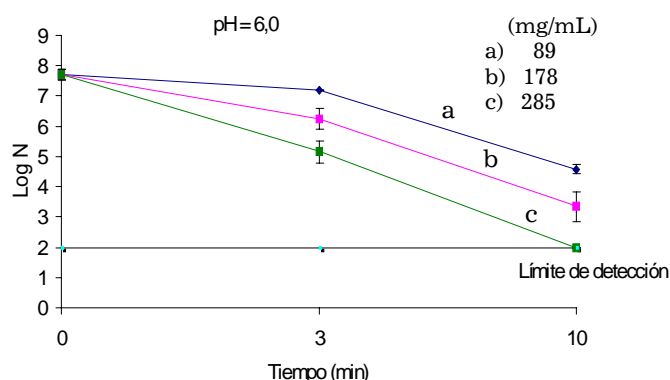


Fig. 3. Inactivación de *S. mutans* con OLEOZON® a pH 6,0.

(reducción de cuatro logaritmos) a pH 7,6 y alcanza un 99,999 % (reducción de cinco logaritmos) a pH 7 y 6.

Para el análisis de la significación de las variables estudiadas sobre la concentración de inactivación celular del OLEOZON®, se realizó

un análisis de regresión lineal múltiple. Se comprobó que los tres factores en estudio presentan un efecto significativo sobre la mortalidad de *Streptococcus mutans* con un nivel de confiabilidad de un 99 % (Tabla 2).

Del análisis de regresión lineal realizada se obtuvo la ecuación:

$$\text{Log } N = 7,147 - 0,008 \text{ Concentración} - 0,404 \text{ Tiempo} + 0,267 \text{ pH}$$

la cual describe la relación que existe entre el log N (número de sobrevivientes) y las tres variables independientes (concentración del OLEOZON®, tiempo y pH), para el modelo experimental en estudio.

Según el análisis, los tres factores tienen una influencia estadísticamente significativa sobre la mortalidad del microorganismo y el tiempo es el de mayor influencia, siendo casi 50 veces más efectivo que la concentración.

Se puede observar que el coeficiente del pH es positivo, lo que indica que a medida que aumenta el pH, se obtiene una disminución de la mortalidad del microorganismo. Esto podría explicarse a través del equilibrio ácido-base de las distintas especies peroxídicas presentes en el OLEOZON®. En el intervalo de pH estudiado, un ligero incremento de él podría desplazar esos equilibrios ácido-base hacia la formación de especies menos activas, disminuyendo de esta forma, la acción letal del OLEOZON® sobre el microorganismo.

CONCLUSIONES

El aceite de girasol ozonizado OLEOZON® es un antimicrobiano efectivo contra *Streptococcus mutans*.

A concentraciones de 178 mg/mL o superiores de OLEOZON® y un tiempo de contacto de 10 min se obtiene un índice de muerte del microorganismo de hasta un 99,9 %.

Los tres factores estudiados presentan un efecto significativo sobre la muerte del microorganismo, lo que demuestra que fueron seleccionados de forma correcta, siendo el tiempo de contacto el de mayor influencia.

El aumento del pH en el sistema, provoca una disminución de la efectividad del aceite de girasol

Tabla 2. Resultados correspondientes al análisis de regresión múltiple.

Parámetros	Estimado	Error estándar	T-testadístico	p
Constante	7,147	0,799	8,942	0,000
Concentración	-0,008	0,001	-6,416	0,000
pH	0,267	0,111	2,401	0,020
Tiempo	-0,404	0,017	-23,089	0,000

ozonizado sobre la muerte del microorganismo, dada por la variación de las especies peroxídicas presentes en él.

La actividad inhibidora determinada sobre *Streptococcus mutans*, es muy similar a la encontrada por otros investigadores al enfrentar el aceite de girasol ozonizado a otras especies del mismo género.

BIBLIOGRAFIA

1. Piatkim K.D. & Krivoshein YU.S. Microbiología con Virología e Inmunología. Ed. MIR Moscú, 265-288, 1980.
2. Alcaide F, Liñares J., Pallarés R., Carratalà J., Benítez M.A., Gudiol F, Martín R. *In vitro* activities of twenty-two β -lactam antibiotics against penicillin-resistant and penicillin-susceptible viridans streptococci isolated from blood. **Antimicrob Agents Chemother.**, **39**, 2243-2247, 1995.
3. Renata A., Vieira U. Correlación entre experiencias de caries a niveles salivares de estreptococos grupo mutans en bebé de 06-36 meses de edad. **Revista Brasileira de Odontología**, **57**, 246-248, 2000.
4. Martínez M. Tratamiento de la gingivitis úlcero-necrotizante aguda con aceite ozonizado. Trabajo en opción del título de Especialista de Primer Grado en Periodoncia, Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana, Facultad de Estomatología, julio, 1995.
5. José F, Isabel N. Efecto antibacteriano de un nuevo medicamento oleo ozonizado comparado con pastas de hidróxido de calcio. **Revista Brasileira de Odontología**, **57**, 252-254, 2000.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, Approved guideline. Vol.19, No. 18, 1999.
7. Lezcano I., Núñez N., Espino M., Gómez M. Antibacterial activity of Ozonized sunflower oil, OLEOZON® against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Ozone Science & Engineering**, **22**, 207-214, 2000.
8. Lezcano I. Actividad antimicrobiana del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. Predefensa de tesis en opción del título de doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana, julio, 2001.
9. Ledea O. Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Químicas, Universidad de la Habana, julio, 2003.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

GENERALIZACION DEL SISTEMA DIRAMIC EN EL PAIS . UNA CONCEPCION ORIGINAL PARA EL DIAGNOSTICO RAPIDO MICROBIOLOGICO.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

El Sistema DIRAMIC se ha conformado como una solución tecnológica original, dentro del sistema microbiológico, capaz de garantizar reportes objetivos y rápidos, sobre la resistencia bacteriana, detectar rápidamente la infección urinaria en muestras directas de orina, permitiendo la identificación de la *E. Coli* simultáneamente en las muestras positivas y organizar los resultados en bases de datos para la confección de reportes a gran escala, mediante los mapas microbianos.

Desde su concepción, el Sistema DIRAMIC incluyó soluciones tecnológicas de gran racionalidad y originalidad, entre las que se destaca la introducción del concepto de lector óptico no convencional a microflujo continuo, que abarató y simplificó notablemente el Sistema.

Otra de las soluciones novedosas que integran esta tecnología son aquellas vinculadas con la determinación del antibiograma. El Sistema DIRAMIC utiliza discos de antibióticos que pueden incorporarse a voluntad, permitiendo conformar juegos atendiendo a las necesidades del cliente, lo que le permite tener una elevada flexibilidad, mantener bajos costos y ser muy competitivo respecto a los juegos de diagnóstico existentes.

El Sistema tiene además, la posibilidad de emplear muestras positivas directas de urocultivos y hemocultivos para la determinación de un antibiograma presuntivo, lo cual propicia un reporte en aproximadamente 28 h de tomada la muestra y con ello, un mayor beneficio para el paciente.

Este Sistema está sustentado en varias invenciones, una de ellas ha sido reconocida como patente en siete países: Cuba, Estados Unidos de América, China, México, Chile Argentina y Filipinas.

Desde hace más de cinco años, se encuentra introducido en el Sistema Nacional de Salud de Cuba, a todo lo largo y ancho del país.

La Red de Hospitales de Cuba que utiliza el Sistema DIRAMIC ha propiciado la atención de unos 200 000 pacientes. Los resultados de los antibiogramas y urocultivos ejecutados y debidamente procesados, han permitido la generación de reportes a diferentes niveles, desde el Hospital hasta la nación, los que han servido para estructurar políticas para el uso de los antibióticos de base objetiva y a gran escala.

En el plano internacional, se ha introducido en 12 laboratorios en México, 40 laboratorios en Brasil y más recientemente, se han exportado 34 equipos con sus juegos de diagnóstico a Venezuela.

Este resultado está propuesto para el Premio Medalla de Oro que otorga la Organización Mundial de la Propiedad Industrial (OMPI).