

## Relazione del 23 dicembre 2016 rev.2

### Valutazione in vitro dell'attività antimicrobica del prodotto

#### OZORAL®

Gel orale muco adesivo a base di olio di semi di girasole ozonizzato (Ozonio 3000).



**Committente:**

**Innovares s.r.l.**

**Via Risorgimento 5/B 42049 Sant'Ilario d'Enza (Re)**

**www.innovares.com**

Rev.0	emissione
Rev.1	Calcolo del logaritmo nella tabella degli inoculi
Rev.2	Correzione nomenclatura actinomycetemcomitans

## **Premessa**

*Fin dal 1973 l'attività analitica e consulenziale del Laboratorio REI S.r.l. si colloca nei settori agro-alimentare, cosmesi e protezione ambientale. Con un laboratorio di 500mq, uno staff tecnico costantemente aggiornato ed attrezzature analitiche d'alto livello, il Laboratorio REI risponde con professionalità alle esigenze della clientela, sia per ciò che riguarda l'efficace esecuzione d'analisi di vario tipo che in merito alla valutazione tecnica ed alla consulenza specifica su aspetti più complessi che spesso accompagnano le normali determinazioni analitiche. Al fine di garantire la massima affidabilità nel prelievo dei campioni, nell'effettuazione delle analisi e nella validazione dei risultati, il Laboratorio REI s.r.l. ha conseguito l'Accreditamento secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova" da ACCREDIA, con il numero 0508, in data ottobre 2003.*

*ACCREDIA accredita i Laboratori di prova operanti in conformità alle prescrizioni ed ai requisiti previsti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, dai documenti ACCREDIA, EA, ILAC; accertando che questi possiedano e mantengano nel tempo i requisiti organizzativi, procedurali, tecnici e professionali richiesti, in termini tali da ingenerare, in tutte le parti sociali ed economiche interessate – e, in particolare, negli utilizzatori e consumatori finali – un elevato grado di fiducia nell'operato di tali soggetti e nel valore delle attestazioni di conformità da essi rilasciate, tale garanzia è realizzata mediante una convenzione quadriennale di Accreditamento stipulata tra ACCREDIA e il Laboratorio REI s.r.l. consultabile presso la sede del laboratorio REI s.r.l.. L'elenco delle prove accreditate è disponibile presso il sito [WWW.ACCREDIA.IT](http://WWW.ACCREDIA.IT)*

## OZORAL®

Gel orale muco adesivo a base di olio di semi di girasole ozonizzato (Ozonia 3000).

### PROGETTO DI RICERCA

#### Valutazione in vitro dell'attività antimicrobica del prodotto

Il Laboratorio REI srl ha ricevuto dalla società Innovares srl l'incarico di eseguire uno studio in vitro sull'attività antimicrobica del prodotto OZORAL®.

Il prodotto OZORAL® svolge un'azione protettiva ed eutrofica del cavo orale ed è utile, come adiuvante, nel trattamento locale di condizioni infiammatorie ed ulcerative

Il presente studio vuole valutare l'azione del preparato nei confronti di microorganismi specifici, di seguito elencati (American Type Culture Collection, ATCC):

**Prevotella Intermedia (ATCC 25611)** patogeno opportunisto, Gram-, non mobile, bastoncino, anaerobio, infezioni cavo orale.

**Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277)** patogeno, Gram-, anaerobio, infiammazione gengive, distruzione tessuti periodontali, eventuale esfoliazione/perdita denti, crea biofilm subgengivali.

**Fusobacterium nucleatum (ATCC 25586)** Gram-, patogeno cavo orale, bastoncino, anaerobio, abilità di coaggregarsi con altre specie, causa gravi infezioni a diversi organi umani.

**Capnocytophaga sputigena (ATCC 33612)** Gram-, bacillo, anaerobio facoltativo, temperatura ottimale di crescita 35-37°C, patogeno opportunisto del cavo orale.

**Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ATCC 29522)** Gram-, bastoncino, anaerobio facoltativo, danneggia i tessuti del cavo orale, forma biofilm.

Il principio dello studio antimicrobico è quello di aggiungere ad un campione del prodotto sottoposto a prova una sospensione batterica di prova e mantenuta a 22°C per un tempo prestabilito.

#### Par.1) Condizioni sperimentali

##### *Terreni colturali:*

Terreno nutritivo in brodo: Brain Heart Infusion (BHI);

Diluente neutralizzante Lethen Broth Base Modified (MLB);

Terreno solido per batteri: Tryptone Soya Agar (TSA);

Terreno isolamento Chocolate Agar;

Terreno isolamento Tryptone Soya Agar (TSA) + sangue di montone.

Incubazione in termostato a 22 +/- 1°C.

## **Par.2) Verifica preliminare del diluente-neutralizzante e sua convalida**

Ad campione di OZORAL sottoposto a prova viene aggiunta una sospensione batterica di prova, a cui va aggiunto un diluente che abbia capacità neutralizzare immediatamente l'attività batterica del conservante presente nel prodotto.

L'inattivazione dell'attività batterica del prodotto deve essere convalidata per ciascuno dei ceppi sottoposti a prova e per ciascuna delle condizioni sperimentali scelte.

Il diluente, che ha dato esito positivo è MLB alla diluizione 1:10.

## **Par.3) Verifica preliminare della contaminazione batterica del prodotto cosmetico:**

Batteri aerobi mesofili < 10 ufc/g secondo metodo di analisi accreditato ISO 21149;

Lieviti e muffe: <10 ufc/g. secondo metodo di analisi accreditato ISO 16212.

## **Par.4) Inoculo dei ceppi nel campione di OZORAL®.**

I microorganismi da testare sono stati fatti crescere:

Prevotella Intermedia, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum in terreno BHI per 5- 7 gg in condizioni di anaerobiosi alla temperatura di incubazione di 35°C.

Capnocytophaga sputigena, Aggregatibacter actinomycetemcomitans in terreno BHI per 24 -48 ore in condizioni di anaerobiosi in CO<sub>2</sub> alla temperatura di incubazione di 35°C.

I microorganismi così ottenuti sono una concentrazione di circa 10<sup>9</sup> tranne la sputigena e actinomycetemcomitans 10<sup>8</sup>, dopo di che si esegue l'inoculo separatamente con 0.2 ml in 20 g di campione per ottenere concentrazione finale di lavoro corrispondente a circa 10<sup>3</sup>cell/ml. Parallelamente si esegue anche un controllo positivo per verificare la correttezza della procedura.

Per verificare la correttezza della procedura di preparazione, il campione inoculato viene analizzato dopo 1 ora, prelevandone 1 g a cui vengono aggiunti 9 ml di MLB e successivamente seminati in piastra su terreno specifico con diluzioni opportune.

Dopo il prelievo, il campione viene messo ad incubare a 22°C in termostato per i successivi prelievi alle scadenze prefissate.

## **Par. 5) Risultati:**

Nella tabella si riportano i risultati dei livelli di inoculo e dei conteggi effettuati alle scadenze previste. Nel caso in cui il dato era inferiore al limite di rilevabilità la differenza tra logaritmi è stata espressa come "maggiore di" (>).

CEPPO	Unità di misura	Inoculo	2 ore	4 ore	1 giorno	2 giorni	7 giorni
<i>Prevotella Intermedia</i>	ufc/g	1.5 x 10 <sup>7</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
	log <sub>10</sub> ufc/g	7.18	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	6.18	6.18	6.18	6.18	6.18
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ufc/g	1.02 x 10 <sup>8</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
	log <sub>10</sub> ufc/g	8.01	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	7.01	7.01	7.01	7.01	7.01
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ufc/g	7.1 x 10 <sup>6</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
	log <sub>10</sub> ufc/g	6.85	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	5.85	5.85	5.85	5.85	5.85
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ufc/g	4.9 x 10 <sup>6</sup>	13 x 10 <sup>4</sup>	<10	<10	<10	<10
	log <sub>10</sub> ufc/g	6.69	5.11	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	<b>1.58</b>	5.69	5.69	5.69	5.69
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ufc/g	1.15 x 10 <sup>6</sup>	<10	<10	<10	<10	<10
	log <sub>10</sub> ufc/g	6.06	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00
	riduzione log.	/	5.06	5.06	5.06	5.06	5.06

La farmacopea definisce per le preparazioni topiche i criteri di accettabilità dell'attività antimicrobica in termini di riduzione logaritmica di microrganismi vivi contro il valore dell'inoculo iniziale secondo la Tabella 5.1.3-2. e sono riportati in Tabella.

	Criteri	Riduzione logaritmica			
		2 giorni	7 giorni	14 giorni	28 giorni
<b>Batteri</b>	A	2	3	-	Nessun Incremento
	B			3	Nessun Incremento
<b>Lieviti e muffe</b>	A	-	-	2	Nessun Incremento
	B			1	Nessun Incremento

Nella tabella successiva riportiamo i valori di riduzione in % rispetto all'inoculo:

CEPPO	Unità di misura	Inoculo	2 ore	4 ore	1 giorno	2 giorni	7 giorni
<i>Prevotella Intermedia</i>	ufc/g	1.5 x 10 <sup>7</sup>	100	100	100	100	100
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ufc/g	1.02 x 10 <sup>8</sup>	100	100	100	100	100
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ufc/g	7.1 x 10 <sup>6</sup>	100	100	100	100	100
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	ufc/g	4.9 x 10 <sup>6</sup>	76.38	100	100	100	100
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ufc/g	1.15 x 10 <sup>6</sup>	100	100	100	100	100

#### Par.6) Conclusioni

Le prove in vitro sperimentali per la valutazione antimicrobica di OZORAL<sup>®</sup> hanno evidenziato un esito molto positivo per i microrganismi testati e rispetta sicuramente i criteri raccomandati di efficacia antimicrobica nei confronti di tutti i microrganismi testati, come previsto nella Tabella 5.1.3-2 della Farmacopea per preparazioni ad uso topico.

#### Par. 7) Bibliografia

UNI EN ISO 11930 Valutazione della protezione antimicrobica di un prodotto cosmetico.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA Contaminazione microbica dei prodotti non obbligatoriamente sterili 2.6.12 e Efficacy of antimicrobial preservation 5.1.3.

Direttore tecnico

Dott chim Attilio Sagner

