

Potencial antimicrobiano de los enjuagues bucales para niños

Elis Fernanda Ferreira Barros¹ , Gabriela Leódido² , Fernanda Vieira Belém³ ,
Luna Chagas Clementino³ , Paulo Antônio Martins-Júnior⁴ , Marco Aurélio Benini Paschoal⁴ .

Resumen: Introducción: Poco se sabe del potencial antimicrobiano de los enjuagues bucales sobre la bacteria *Streptococcus mutans*. El **objetivo** de este estudio *in vitro* fue investigar los efectos antimicrobianos de los enjuagues bucales para niños contra esas bacterias. **Materiales y métodos:** En este estudio *in vitro*, se usó la cepa de *S. mutans* para realizar zonas de inhibición mediante prueba de difusión en agar. Las placas de agar Brain Heart Infusion (BHI) se dividieron en cuadrantes: G1 - cloruro de cetilpiridinio (Cepacol Teen®); G2 - xilitol y triclosán (Dentalclean Garfield®); G3: *Malva sylvestris*, xilitol (Malvatrikids Jr®) y G4: solución de tampón fosfato salino (PBS). Después del ajuste de las bacterias, se sembró una alícuota de cada grupo en el agar BHI y se transfirió a una atmósfera a 37°C durante 48 horas para realizar las mediciones de las zonas de inhibición. Los datos se analizaron mediante ANOVA de un factor para la comparación entre grupos ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** Se verificaron zonas de inhibición solo para G1 ($10,82 \pm 2,13$) y G3 ($12,75 \pm 1,04$). No se verificó diferencia estadística significativa entre G1 y G3 ($p = 0,287$) y G2 y G4 ($p \geq 0,05$). **Conclusión:** A pesar de los efectos beneficiosos de los enjuagues bucales, una combinación de xilitol y triclosán no fue eficaz para controlar el crecimiento de *S. mutans* en esta condición *in vitro*.

Palabras clave: Bacteria; Antisépticos Bucales; *Streptococcus mutans*, niño, técnicas *in vitro*.

Potencial antimicrobiano dos enxaguantes bucais para crianças

Resumo: Introdução: Pouco se sabe sobre o potencial antimicrobiano dos enxaguantes bucais em relação à bactéria *Streptococcus mutans*. O **objetivo** deste estudo *in vitro* foi investigar o efeito antimicrobiano de enxaguatórios bucais infantis contra essa bactéria. **Materiais e métodos:** Este estudo *in vitro* utilizou a cepa de *Streptococcus mutans* para gerar zonas de inibição por meio do teste de difusão em ágar. As placas de ágar BHI foram divididas em quatro quadrantes, seguindo os grupos: G1- Cloreto de Cetilperidíneo (Cepacol Teen®); G2- xilitol e triclosan (Dentalclean Garfield®); G3- Malva silvestres e xilitol (Malvatrikids Jr®) e G4- solução salina tamponada com fosfato. Após o ajuste das bactérias, uma alíquota de cada grupo foi semeada no ágar BHI e transferida para uma atmosfera a 37°C por 48 horas, para medir as zonas de inibição. Os dados foram analisados, utilizando ANOVA one-way, para comparação intergrupos ($\alpha = 0,05$). **Resultado:** As zonas de inibição foram verificadas em G1($10,82 \pm 2,13$) e G3($12,75 \pm 1,04$), com ausência de zonas de inibição para outros grupos estudados. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre G1 e G3 ($p=0,287$) e G2 e G4 ($p \geq 0,05$). **Conclusão** Apesar dos efeitos benéficos dos enxaguantes bucais, uma combinação de xilitol e triclosan não foi eficaz no controle do crescimento de *S. mutans* nessa condição *in vitro*.

Palavras-chave: bacterias; antissépticos bucais; *Streptococcus mutans*, criança, técnicas *in vitro*.

¹ DDS, Universidad CEUMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

² DDS, MSc, Programa de Postgrado en Odontología, Universidad CEUMA, São Luís, Maranhão, Brasil.

³ DDS, Programa de Postgrado en Odontología, Universidad Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - MG, Brasil.

⁴ DDS, MSc, PhD, Departamento de Salud Bucal Infantil y Adolescente, Universidad Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - MG, Brasil

Antimicrobial potential of child mouthwashes

Abstract: Introduction: Little is known about the antimicrobial potential of mouthwashes in *Streptococcus mutans* bacteria. The **objective** of this *in vitro* study was to investigate the antimicrobial effects of infant mouthwashes against those bacteria. **Materials and methods:** This *in vitro* study used *S. mutans* strain to perform inhibition zones by agar diffusion test. Brain Heart Infusion (BHI) agar dishes were divided into quadrants: G1 – cetylperidinium chloride (Cepacol Teen®); G2 – xylitol and triclosan (Dentalclean Garfield®); G3 – Malva sylvestris, xylitol (Malvatríkids Jr®) and G4 - phosphate buffer saline (PBS). After adjustment of bacteria, an aliquot of each group was plated on the BHI agar and transferred to an atmosphere at 37°C for 48 hours to perform the inhibition zones measurements. The data was analyzed by one-way ANOVA for intergroup comparison ($\alpha = 0.05$). **Results:** Inhibition zones were verified only to G1 (10.82 ± 2.13) and G3 (12.75 ± 1.04). No significant statistical difference was verified between G1 and G3 ($p = 0.287$) and G2 and G4 ($p \geq 0.05$). **Conclusion:** Despite of the beneficial effects of mouthwashes, a combination of xylitol and triclosan was not effective to control *S. mutans* growth in this *in vitro* condition.

Key words: bacteria; mouthwashes, *Streptococcus mutans*, child, *in vitro* techniques.

Introducción

Actualmente, la caries dental se considera una disbiosis debido a un cambio microbiano en el ambiente oral que permite el crecimiento de bacterias cariogénicas, especialmente *Streptococcus mutans* (*S. mutans*).¹ Este desequilibrio, en parte, se debe al alto contenido de azúcares en la dieta, que disminuye los niveles de pH oral y favorece la desmineralización de las estructuras duras de los dientes.² En consecuencia, la etiología de la caries dental es multifactorial y, por lo tanto, implica no solo la presencia de biopelícula, sino también el flujo y la capacidad tampón de la saliva, la cantidad y frecuencia de ingesta de azúcares, y frecuencia y calidad del cepillado dental. Además, otros factores indirectos como los ingresos, la educación y el comportamiento individual también pueden influir en la progresión de esta condición.³

De esa forma, el uso de enjuagues bucales se considera un enfoque factible a nivel individual para el control de esta

enfermedad.⁴ Esta puede ser una forma inocua y eficiente de proporcionar agentes antimicrobianos que eviten la adhesión y el crecimiento bacteriano.⁵ Entre los antimicrobianos más utilizados, el cloruro de cetilpiridinio, triclosán y gantrez, clorhexidina y xilitol⁶ se consideran opciones viables debido a sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas. En este sentido, una revisión sistemática que involucró estudios con niños y adolescentes encontró evidencia de alta calidad de que el uso de clorhexidina en los enjuagues bucales contribuye a una reducción significativa de la placa dental.⁷ Sin embargo, aún se necesitan más estudios para confirmar los efectos del uso de clorhexidina en prevenir la caries dental o reducir los niveles de *S. mutans* en este grupo de edad.⁸ Además, la incorporación de ion fluoruro puede proporcionar protección y remineralización del ambiente bucal del huésped durante los ciclos de disminución del pH. Por tanto, su uso es muy recomendable para pacientes con riesgo de desarrollo de caries, con coordinación motora inmadura y para

individuos cuya desorganización del *biofilm* es insatisfactoria.^{6,9-11}

Los enjuagues bucales se pueden encontrar fácilmente en los mercados y se comercializan sin necesidad de prescripción médica, lo que da como resultado el libre acceso a la población, sin atención especial. Aunque los enjuagues bucales presentan resultados satisfactorios cuando se prescriben y utilizan correctamente, su uso indiscriminado conlleva varias desventajas que pueden superponerse a los beneficios, como los riesgos de alteración del gusto y alteraciones patológicas de la mucosa.^{12,13} Además, tienen potencial para modificar la homeostasis del entorno local, lo que resulta en resistencia bacteriana o colonización de la mucosa oral con nuevos microorganismos, especialmente en niños.^{2,6,9,14} Se debe prestar especial atención al uso no prescrito y no controlado en niños, particularmente en aquellos donde está madurando/formando su microbiota oral.^{12,14} Considerando todo lo anterior y el escaso acceso a información relevante y actualizada sobre enjuagues bucales para niños, el propósito de este estudio fue investigar los efectos antimicrobianos de los enjuagues bucales para niños contra *S. mutans*.

Materiales y métodos

Grupos evaluados

Se evaluó la susceptibilidad de la cepa de *S. mutans* UA 159 (ATCC700610) a los siguientes agentes antimicrobianos que se encuentran en los enjuagues bucales para niños: G1 - cloruro de cetilpiridinio (Cepacol

Teen®, Suzano, Brasil); G2 - xilitol y triclosán (Dentalclean Garfield®, Londrina, Brasil) y G3 - Malva sylvestris, xilitol (Malvatrikids Jr®, Río de Janeiro, Brasil). Se utilizó una solución de tampón fosfato salino (PBS - Laborclin®, Pinhais, Brasil) como grupo de control (G4). Es importante señalar la presencia de fluoruro de sodio (NaF a 225 ppm) en todos los productos evaluados. Todas las soluciones fueron evaluadas mediante el método de difusión en agar en medio sólido, verificando las zonas inhibitorias siguiendo el estándar de consenso del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) para pruebas microbiológicas.¹⁵

Preparación de inóculo bacteriano

Se reactivó una cepa estándar de *S. mutans* UA 159 (ATCC700610) en un caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck®, Darmstadt, Alemania) a 1% de glucosa y se incubó con 5% de CO₂ a 37°C durante 18-24 horas. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 2.800 rpm (Fanem®, São Paulo, Brasil) y se lavó en un PBS estéril para eliminar el exceso del medio de cultivo y luego se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener un sedimento bacteriano libre de caldo de cultivo. A continuación, se ajustó la turbidez (densidad óptica) de la suspensión mediante un espectrofotómetro (BEL Engineering®, São Paulo, Brasil), con una longitud de onda de 540 nm similar a la solución stock de 1 x 10⁶.¹⁶

Método de difusión de agar

En el centro de las placas BHI se sembraron 50µL de solución ajustada y se esparcieron

con el apoyo de un mango en L sobre la superficie de las placas estudiadas. Posteriormente, se realizaron cuatro pozos por plato con el objetivo de recibir los enjuagues bucales probados (G1-G3) y el grupo control (G4). Luego, se transfirieron a una atmósfera microaerófila a 37°C durante 48 horas. Después de este período, las zonas antimicrobianas se midieron con un paquímetro digital (Digimess Instrumentos de Precisão Ltda®, São Paulo, Brasil)¹⁵.

Análisis estadístico

Después de las mediciones, los resultados se introdujeron en Excel 2010 (Microsoft Office 2010, EE. UU.) y se analizaron como estadísticas descriptivas considerando el resultado como la suma de las medias de los diámetros de zona (mm) dividido por el número de placas utilizadas en este estudio (n = 9). Después de este paso, se probó la normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro Wilk (p < 0.05). La comparación intergrupala de los valores de diámetro inicial y final se realizó utilizando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. El nivel de significancia se fijó en 5%. El análisis de datos se realizó en el software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versión 23.0, SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

Resultados

Se crearon zonas de inhibición para las muestras G1 (10.82 ± 2.13) (Figura 1a) y G3 (12.75 ± 1.04) (Figura 1b), las cuales presentaron agentes activos de cloruro de cetilpiridinio y Malva sylvestris/xilitol,

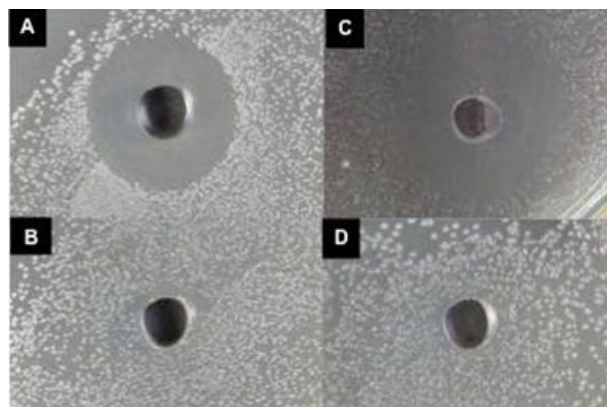


Figura 1. Imágenes ilustrativas de las zonas de inhibición de todos los grupos mediante el método de difusión en agar. A. Cloruro de cetilpiridinio. B. Xilitol y triclosán (G2). C. Malva sylvestris y xilitol (G3). D. PBS (G4).

respectivamente (Tabla 1). En las muestras de G2 (xilitol y triclosán), no se verificaron zonas de inhibición (Figura 1c), lo que indica una falta de potencial antimicrobiano contra *S. mutans*. Además, los resultados de G4 (control negativo) mostraron la confianza de la prueba microbiana por la ausencia de zona de inhibición (sin contaminación y tampoco zonas de inhibición) (Figura 1d). No se verificaron diferencias significativas entre G1 y G3 (p = 0.27) y entre G2 y G4 (p ≥ 0,05).

Tabla 1. Zonas de inhibición (mm) de los grupos evaluados.

Groups	Inhibition zones (mm)
G1- Cepacol Teen®	10.82 (± 2.13) ^a
G2- Dentalclean Garfield®	0.0 ^b
G3- Malvatrikids Jr®	12.75(± 1.04) ^a
G4- PBS	0.0 ^b

*Diferentes letras minúsculas indican diferencia estadística. ANOVA a un factor seguido de la prueba de Tukey. N = 9.

Discusión

Los agentes antimicrobianos se han utilizado comúnmente en odontología para el control de patologías orales.¹¹ Los enjuagues bucales son agentes antimicrobianos eficaces que previenen la adhesión de la biopelícula.⁹ La reducción o erradicación de la biopelícula está parcialmente relacionada con el uso de sustancias químicas incorporadas en dentífricos o enjuagues bucales.^{9,17} Se debe investigar el uso generalizado de enjuagues bucales porque puede modificar la homeostasis del ambiente local, resultando en resistencia bacteriana o colonización de la mucosa oral con nuevos microorganismos.^{2,9,14} Por lo tanto, este estudio investigó los efectos antimicrobianos de los enjuagues bucales infantiles de cloruro de cetilpiridinio. (Cepacol Teen®, Suzano, Brasil), triclosán y xilitol (Dentalclean Garfield®, Londrina, Brasil), Malva sylvestris y xilitol (Malvatríkids Jr®, Rio de Janeiro, Brasil) contra cepas de referencia de *Streptococcus mutans* UA159 (ATCC700610) por el método de difusión en agar. Este estudio es relevante al investigar las sustancias presentes en los enjuagues bucales comúnmente disponibles en los mercados y la evaluación de los efectos positivos y negativos en la microbiota oral, para ayudar a una mejor indicación del uso y frecuencia de los enjuagues bucales, especialmente en niños.

Este estudio demostró que el agente activo cloruro de cetilpiridinio (Cepacol Teen®, Suzano, Brasil) tenía un efecto antimicrobiano sobre *S. mutans* al formar una zona de inhibición de 10,82 mm de tamaño. Otros estudios que evaluaron

la acción de enjuagues bucales que contienen cloruro de cetilpiridinio contra cepas de microorganismos cariogénicos presentaron resultados similares a esta investigación.^{18,19} Adicionalmente, Latimer *et al.*² revelaron que los enjuagues bucales que contienen el mismo principio activo también mostraron resultados satisfactorios contra bacterias orales, incluyendo *S. mutans*. En este estudio, los agentes activos de Malva sylvestris/xilitol (Malvatríkids Jr®, Rio de Janeiro, Brasil) también resultaron en una zona de inhibición de 12,75 mm. Sin embargo, la asociación de triclosán y xilitol no mostró resultados efectivos. La asociación entre xilitol, fluoruro y triclosán ha mostrado, *in vivo*, una reducción significativa de las cepas de *S. mutans*. Este resultado se puede atribuir al efecto sinérgico de estas tres sustancias. Se encontró que el xilitol (edulcorante natural) tiene propiedades que contribuyen a disminuir el riesgo de caries, como resultado de reducir la adhesión y la producción de ácido por la biopelícula.¹⁹

No se observó zona de inhibición para el agente activo triclosán, el cual mostró no tener acción antimicrobiana contra el microorganismo probado. Sin embargo, Prasanth *et al.*²⁰ evaluaron un enjuague bucal que contenía triclosán y observaron una zona de inhibición considerable para *S. mutans*. Cabe señalar que el enjuague bucal utilizado por los autores contenía alcohol etílico en su composición, el cual difiere del enjuague bucal utilizado en el presente estudio. Sin embargo, el alcohol etílico no parece influir en la acción del triclosán sobre la formación de la biopelícula.²¹ Un estudio similar, también realizado para evaluar el efecto de un

enjuague bucal que contiene triclosán en comparación con la clorhexidina al 0,12%, demostró una acción similar y significativa entre los grupos considerando la reducción en el número de *S. mutans* presentado en 30 niños.¹⁹

Aunque hubo un efecto positivo, este estudio *in vitro* presenta limitaciones. Se verificó la acción de los enjuagues bucales con relación al agente bacteriano *S. mutans*, pero no se verificaron los efectos de estas sustancias sobre la biopelícula o considerando su característica cariogénica. Son necesarios más estudios *in vitro* que incluyan estos factores y se asocien con el potencial neutralizante de la acción de la saliva. También se recomiendan estudios adicionales *in vivo*, que pueden dilucidar mejor estos hallazgos.

Conclusión

Entre los enjuagues bucales para niños probados, el cloruro de cetilpiridinio (Cepacol Teen®, Suzano, Brasil) y los agentes activos Malva sylvestris/xilitol (Malvatrikids Jr®, Río de Janeiro, Brasil) mostraron efectos antimicrobianos sobre *S. mutans*. Sin embargo, se necesitan más estudios clínicos para dilucidar mejor la eficacia real de los enjuagues bucales en este público específico.

Agradecimientos

A la MSc. Esp. Kasandra Verónica Yupanqui Barrios por el apoyo en la elaboración del presente artículo.

Conflicto de intereses: no existen conflictos de intereses relacionados con esta obra.

Referencias bibliográficas

1. Sanz M, Beighton D, Curtis MA, *et al.* Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2017;44 Suppl 18:S5-S11.
2. Latimer J, Munday JL, Buzza KM, Forbes S, Sreenivasan PK, McBain AJ. Antibacterial and anti-biofilm activity of mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and sodium fluoride. *BMC Microbiol.* 2015; 15:169.
3. Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55(1):33-40.
4. Yang SJ, Han SH, Lee AR, *et al.* Evaluation of antimicrobial effects of commercial mouthwashes utilized in South Korea. *BMB Rep.* 2015;48(1):42-47.
5. Abu-Obaid E, Salama F, Abu-Obaid A, Alanazi F, Salem M, Auda S. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effects of Different Mouthrinses against *Streptococcus Mutans*: An *in Vitro* Study. *J Clin Pediatr Dent.* 2019;43(6):398-407.
6. Sampaio GG, Leódido G, Gonçalves LM, Paschoal MA. *In vitro* antimicrobial potential of infant mouthwashes against *streptococcus mutans* biofilm: A preliminary study. *Indian J Dent Res.* 2019;30(3):399-402.
7. James P, Worthington HV, Parnell C, *et al.* Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;3(3):CD008676.

8. Walsh T, Oliveira-Neto JM, Moore D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(4):CD008457.
9. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):441-454.
10. Williams MI. The antibacterial and antiplaque effectiveness of mouthwashes containing cetylpyridinium chloride with and without alcohol in improving gingival health. *J Clin Dent.* 2011;22(6):179-182.
11. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010;38 Suppl 1: S6-S10.
12. Malhotra R, Grover V, Kapoor A, Saxena D. Comparison of the effectiveness of a commercially available herbal mouthrinse with chlorhexidine gluconate at the clinical and patient level. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(4):349-352.
13. Nagappan N, John J. Antimicrobial efficacy of herbal and CHX mouth rinse – A systematic review. *IOSR J Dent Med Sci.* 2012; 2:5-10.
14. Ciancio SG. Mouthwashes: Rationale for use. *Am J Dent.* 2015;28 Spec No A:4A-8A.
15. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 6th edition.* M7-A6. NCCLS, Wayne, PA.
16. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2015; 30:888-890.
17. Fernandez Y Mostajo M, Exterkate RAM, Buijs MJ, Crielaard W, Zaura E. Effect of mouthwashes on the composition and metabolic activity of oral biofilms grown *in vitro*. *Clin Oral Investig.* 2017;21(4):1221-1230.
18. Evans A, Leishman SJ, Walsh LJ, Seow WK. Inhibitory effects of antiseptic mouthrinses on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Aust Dent J.* 2015;60(2):247-270.
19. Subramaniam P, Nandan N. Effect of xylitol, sodium fluoride and triclosan containing mouth rinse on *Streptococcus mutans*. *Contemp Clin Dent.* 2011;2(4):287-290.
20. Prasanth M. Antimicrobial efficacy of different toothpastes and mouthrinses: an *in vitro* study. *Dent Res J.* 2011;8(2):85-94.
21. Almerich JM, Cabedo B, Ortolá JC, Poblet J. Influence of alcohol in mouthwashes containing triclosan and zinc: an experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol.* 2005;32(6):539-544.

Recibido: 21/11/21

Aceptado: 04/09/22

Correspondencia: Marco Aurélio Benini Paschoal, marcobpaschoal@hotmail.com