Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina

ISMAEL YEVENES L
JUAN REYES Y
NESTOR CAMPOS P
VICTOR SARAGONI F

Ismael Yévenes L, Juan Reyes Y, Nestor Campos P, Víctor Saragoni F. Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. Av Periodon Implantol. 2003; 15, 1: 19-24.

RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar en 20 voluntarios el efecto sobre el crecimiento de placa en 24 horas de enjuagatorios de clorhexidina, medir in vitro su actividad microbicida y determinar la concentración de clorhexidina. Tres enjuagatorios comerciales fueron usados, denominados A, B y C, los dos primeros con 0,12% y el tercero con 0,1% de clorhexidina.

El efecto sobre el crecimiento de placa en 24 horas se determinó midiendo área de placa e índice de placa en tres estudios cruzados doble ciego. Las propiedades microbicidas fueron determinadas por un ensayo de inhibición del desarrollo del *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y *Candida albicans*. La determinación de clorhexidina fue realizada por cromatografía HPLC.

No se encontraron diferencias significativas en la placa formada a las 24 horas después del uso de los enjuagatorios pero menos placa se desarrolló con clorhexidina al compararla con el control. Las concentraciones de clorhexidina fueron 0,1174%, 0,1168% y 0,091% para A, B y C respectivamente, valores estables después de 16 meses de elaboración. Las concentraciones en clorhexidina para A y B son valores normales mientras que el valor de C está bajo el valor declarado. Los enjuagatorios presentan actividad microbicida contra los microorganismos usados con un tiempo de inactivación del crecimiento menor o igual a 30 segundos.

Las metodologías usadas permiten confirmar la efectividad de los enjuagatorios con diferentes concentraciones de clorhexidina, donde los resultados claramente sugieren que 0,1% en clorhexidina es capaz de tener actividad antiplaca y antimicrobiana cuando es usada en colutorios, no siendo necesarias concentraciones más elevadas.

PALABRAS CLAVE

Clorhexidina; enjuagatorios; antibacteriano; antiplaca; HPLC

INTRODUCCIÓN

La clorhexidina, antiséptico bisbiguanido, es usado en clínica dental comúnmente (1,2). Presenta propiedades antibacteriana y es formulado como enjuagatorio, siendo esta formulación la más empleada, presentándose en varias concentraciones (3,4). El uso de enjuagatorios de clorhexidina es común en la población chilena.

Las revisiones bibliográficas confirman que la clorhexidina es el más efectivo agente antiplaca (5,6). La eficacia clínica está relacionada a su naturaleza dicatiónica lo que permitiría explicar su actividad antimicro-

* Departamento Ciencias Físicas y Químicas. Facultad de Odontología. Universidad de Chile. Chile.

biana prolongada por interacciones electrostáticas entre la clorhexidina y moléculas con carga en la cavidad oral (7,8,9). La clorhexidina es el agente antimicrobiano bucal mas usado, efectivo y documentado en eliminar o disminuir el *Streptococcus Mutans* en procesos dependientes de este microorganismo (10,11). La eficacia antimicrobiana de la clorhexidina permite controlar otras bacterias orales como el lactobacilo (12) siendo además efectivo en el control de hongos orales como la *Candida albicans* (13,14)

Otra de las acciones descritas para la clorhexidina es su efecto sobre la placa microbiana, donde mediciones de áreas de placa e índice de placa permiten cuantificar el efecto de la clorhexidina sobre el crecimiento de la placa en 24 horas, estas mediciones permiten con un cierto grado de certeza evaluar agentes y formulaciones antiplaca (15)

En la determinación de clorhexidina en colutorios se ha descrito el uso de la cromatografía líquida HPLC, sistema rápido, sencillo y específico (16). Este sistema permite además determinar la clorhexidina en diferentes fluidos biológicos como orina, suero, saliva con una sensibilidad bastante alta (17,18,19, 20).

El propósito de este estudio, fue medir el efecto sobre el crecimiento de placa microbiana en 24 horas por colutorios de clorhexidina existentes en el mercado chileno, además de determinar su concentración en clorhexidina mediante cromatografía HPLC y medir su actividad antibacteriana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tres marcas de enjuagatorios con clorhexidina presentes en el mercado farmacéutico chileno, Perioaid®, Oralgene®, Dentilim®, denominados A, B y C respectivamente, fueron usados en este estudio. Todas las muestras de enjuagatorio (5 de A, 5 de B y 6 de C), tienen diferentes fechas de fabricación y fueron obtenidos de diferentes mercados. Dos de los enjuagatorios A y B tienen la misma formulación con un 0,12% de digluconato de clorhexidina y C presenta una concentración de 0,10%.

Medición del efecto de la clorhexidina sobre el crecimiento de placa en 24 horas. El efecto de la clorhexidina sobre la placa microbiana se midió en tres estudios doble ciego, en 20 alumnos voluntarios y en una distribución al azar de los enjuagatorios. Los voluntarios presentaban una buena higiene oral y salud gingival, con 22 dientes medibles y sin prótesis o frenillos. En la mañana de cada estudio, los voluntarios se cepillaron con pasta de dientes y agua por dos minu-

tos. Luego los dientes fueron coloreados con eritrosina y la placa residual fue removida con una copa de goma sin pasta de pulir. Los voluntarios se enjuagaron con 10 ml por 3 minutos con el producto seleccionado con la supervisión de un investigador. La higiene oral fue suspendida por 24 horas y la placa acumulada después de ese tiempo fue revelada con eritrosina y contada por el índice de placa de Turesky y col (21) y por el índice de superficie de placa teñida de Addy y col (22) para superficies bucales de incisivos, caninos y premolares. Un periodo de espera de 7 días como mínimo se observó con una higiene normal antes de realizar los otros estudios con los otros enjuagatorios, determinando en saliva la concentración de clorhexidina residual como control. En el primer estudio se utilizó el enjuagatorio A como producto activo y como control un enjuagatorio sin clorhexidina. En el 2° y 3° estudio se utilizaron los enjuagatorios B y C respectivamente y el mismo colutorio control. Los estudios se separaron entre sí por un periodo de 4 semanas.

Métodos estadísticos. Comprobado que los índices de placa y superficie muestran una distribución normal, los datos fueron analizados para datos paramétricos utilizando el test de t de Student.

Determinación de clorhexidina. Un sistema de cromatografía líquida (HPLC) Merck Hitachi Diodo Array, con un detector fijado a 254 nm, una columna Bondapack C18 de 15 cm como fase estacionaria y una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo agua: 50/50, 0,1% de hexasulfonato de sodio y 1% ácido acético glacial, permiten la determinación de clorhexidina.

Procedimiento. Una alícuota de 100 µl de solución estándar de clorhexidina (0,02 mg/ml) y 100 µl de la solución problema (2ml del enjuagatorio/100ml de fase móvil), fueron inyectados en la columna. El porcentaje de clorhexidina fue calculado a través de la relación: $100 (Au/As)/(Cs/Cu)$, donde Au, es el área de la clorhexidina de la solución problema, As, área de la solución estándar y Cs y Cu son las concentraciones de la clorhexidina en las soluciones estándar y problema respectivamente.

Determinación de propiedades antibacterianas. Estas fueron medidas a través de un ensayo de inhibición de desarrollo bacteriano, colocando los enjuagatorios a distintos tiempos de contacto con tres cepas de la zona bucal: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Actinomyces viscosus* (ATCC 19246) y *Candida albicans* (ATCC 10231). Las muestras utilizadas correspondieron a los enjuagatorios con la fecha de fabricación más antigua.

Inoculos de Prueba. *S. mutans* fue cultivado por 24 horas a 37°C en infusión de Brain Heart. *A. viscosus*,

Tabla 1
CONCENTRACIÓN DE CLORHEXIDINA EN ENJUAGATORIOS

N° de Muestra	A		B		C	
	Antigüedad (meses)	(Clorh.) %	Antigüedad (meses)	(Clorh.) %	Antigüedad (meses)	(Clorh.) %
1	4	0,119	05	0,118	5	0,091
2	6	0,119	08	0,116	7	0,090
3	9	0,115	10	0,115	9	0,085
4	11	0,116	14	0,119	11	0,086
5	16	0,118	16	0,116	12	0,099
6	—	—	—	—	16	0,093
Promedio		0,1174		0,1168		0,091
D.S.		1.8×10^{-3}		1.6×10^{-3}		4.6×10^{-3}

(Clorh.)= concentración clorhexidina. D.S.= desviación estandar. A= colutorio. A. B= colutorio B. C= colutorio C

Tabla 2
PROMEDIOS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE ÁREAS E ÍNDICES DE PLACA (mm²) SEGUIDO AL USO DE COLUTORIOS CON CLORHEXIDINA

	Estudio 1 (A)		Estudio 2 (B)		Estudio 3 (C)	
	Clorh.	Con.	Clorh.	Con.	Clorh.	Con.
Area	3.78	7.33	3.83	8.03	3.75	7.95
Placa	(1.28)	(2.06)	(1.52)	(2.40)	(1.35)	(2.33)
Indice	1.25	1.95	1.20	1.81	1.18	1.88
Placa	(0.23)	(0.59)	(0.25)	(0.53)	(0.35)	(0.47)

(Clorh.)= Clorhexidina Con. A= colutorio. A. B= colutorio B. C= colutorio C. (...) = desviación estándar. n= 20.

cultivado por 48 horas en microaerofilia en medio de tioglicolato. *C. albicans*, cultivada por 24 horas a 37°C en caldo de Sabouraud Dextrosa.

Medio de cultivo de recuperación. Se utilizó los mismos medios del inóculo más lecitina como agente neutralizante.

Procedimiento. A 0,5 ml del inóculo de prueba se agregó 5 ml del enjuagatorio sin diluir, la mezcla se agitó y se mantuvo a 37°C. Se determinó la viabilidad de la mezcla inóculo-enjuagatorio a 30, 60, 120 y 300 segundos después de la inoculación. Para esto se transfirió una azada de la mezcla al medio de cultivo de recuperación a los mismos tiempos. Las muestras fueron incubadas a 37°C por 48 horas observando promoción del crecimiento microbiano.

RESULTADOS

Los resultados de los análisis de clorhexidina en los enjuagatorios son resumidos en la Tabla 1. Esta infor-

ma la distribución de las muestras para las tres marcas, variando para A de 4-16 meses de antigüedad, y para las muestras B y C variaron de 5-16 meses de antigüedad. Los valores promedios de clorhexidina para la marca A fue de un 0,1174%, para B fue de un 0,1168% y para C fue de un 0,091%.

Medición del efecto de la clorhexidina sobre el crecimiento de placa en 24 horas. Grupos de 20 voluntarios participaron en los tres estudios, pero solo 17 alumnos participaron en los tres estudios. El promedio y la desviación estándar para los índices de placa y superficie se muestran en la Tabla 2. En los tres estudios tanto el índice de placa como el índice de superficie de placa medidos después de 24 horas tras la aplicación única del enjuagatorio son menores en los enjuagatorios con clorhexidina comparada con el control, siendo las diferencias altamente significativas ($p=0,001-0,003$). Una comparación interestudios de los índices de placa y superficie de placa, no revela diferencias significativas entre los enjuagatorios con clorhexidina de diferentes concentraciones ($p=0,5-0,7$), para el estudio de comparación los datos fueron analizados a través del test Kruskal-Wallis.

Los resultados de viabilidad de los microorganismo con las muestras de enjuagatorios de clorhexidina nos señala que A, B y C, tienen acción microbici da, en las condiciones de este estudio, frente a los microor ganismos testados. En todos los casos, utilizando el enjuagatorio de data mas antigua, el tiempo de inacti vación fue menor o igual a 30 segundos.

DISCUSIÓN

Los resultados nos indican que la clorhexidina pre sente en los colutorios utilizados tienen efecto tanto sobre el crecimiento de la placa microbiana in vivo como el desarrollo bacteriano in vitro.

El uso de la cromatografía líquida HPLC permitió la determinación exacta de clorhexidina en los coluto rios utilizados en la investigación clínica así como el análisis de clorhexidina residual salival en los volun tarios previo aun nuevo tratamiento. Esta metodología es de fácil aplicación, alta sensibilidad, y una repro ducibilidad para un amplio rango de concentraciones de clorhexidina (23). Las determinaciones de clorhe xidina en los colutorios A y B están dentro de los lími tes de aceptabilidad para estos productos. Con res pecto al enjuagatorio C, este esta bajo la norma, pero no es un problema de estabilidad de la clorhexidina, si no de la formulación que entrega una cantidad menor que la declarada.

Para visualizar los efectos de la clorhexidina en su acción microbici da, se puede ver que las cepas bac terianas seleccionadas para el estudio fueron adecua das, porque tanto *S. Mutans* como *A. Viscosus* están pre sentes en la placa microbiana normal y tienen inci dencia directa en la formación de la caries dental. Por otro lado, *C. albicans* esta también relacionadas a patologías comunes de la cavidad bucal. Ninguno de estos microorganismos fue capaz de crecer en pre sencia de los enjuagatorios que contiene clorhexidi na, así organismos anaerobios (*A. Viscosus*) como aeróbicos (*S. Mutans* y *C. albicans*) fueron igualmente afectados por la clorhexidina confirmando su amplio espectro de acción, a pesar de la diferencia de con centración de los colutorios. Luego este tipo de enju a gatorio puede efectivamente controlar el crecimiento de bacterias y hongos orales.

Con respecto a la acción de la clorhexidina sobre el crecimiento de la placa microbiana, este estudio ha demostrado que enjuagatorios con clorhexidina son muy superiores a controles sin clorhexidina en estu dios de 24 horas de duración. Pero no señala diferen cias significativas en los índices de placa y superficie de placa al comparar colutorios de clorhexidina de

diferente concentración siendo las dos concentracio nes utilizadas efectivas en el control de placa. Estos resultados indican que estos ensayos de corto tiempo pueden ser usados en la selección de potenciales agentes o productos con acción antiplaca, usando índices convencionales de placa como el índice de area de placa de Turesky et al. (21) modificado de Quigley y Hein (24) y el índice de placa de Addy et al. (23) modificado de Shaw y Murray (25), este méto do tiene un alto conteo y es altamente discriminatorio.

Los resultados obtenidos con el enjuagatorio C, tanto por su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de placa como por su efecto microbici da sobre las cepas bacterianas usadas, nos lleva a pensar que la concen tración de 0,1% de digluconato de clorhexidina declarada en esta formulación, son suficientes para satisfacer las propiedades asignadas a la clorhexidina de tener actividad antibacteriana y antiplaca, e inclu so obtenidas con concentraciones menores, pues la concentración promedio determinada en el colutorio C fue de 0,091%. Se hace necesario entonces revisar las concentraciones de clorhexidina utilizadas en los enjuagatorios pues se podrían estar utilizando concen traciones mayores a las necesarias y por lo tanto incrementando la posibilidad de reacciones adversas a este producto.

SUMMARY

The purpose of this study was to measure plaque regrowth over 24 h. (*in vivo*) and microbicidal activity (*in vitro*), and to determine the concentration of chlorhexidine in mouthwashes. Three commercial mouthwashes were used, A, B, whit 0.12 % and C whit 0.10 % of digluconate of chlorhexidine. The effect on 24-h plaque regrowth were measured using of plaque area and plaque index in 3 double-blind studies in 20 sub jects. For chlorhexidine concentration studies, sam ples all with different date of elaboration, were employ ed. The assessment of chlorhexidine was performed by HPLC chromatography. Microbicidal properties were measured by an inhibition assay of development of: *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* and *Candida albicans*.

Not significant differences plaque reformed after using the three chlorhexidine mouthwashes but less plaque developed whit the chlorhexidine compared with control.

The chlorhexidine concentration were 0.1174%, 0.1168% and 0.091% for A, B and C samples respec tively, stability values after 16 months of elaboration respectively. Thus, A and B mouthwashes had normal

values of chlorhexidine, while that, for C it would be below its declared value. The most dated samples of mouthrinses had microbicidal activity against the tested micro-organisms. The inactivation time of bacterial growth was lesser or equal to 30 seconds.

The methodologies applied allow to determine the effectiveness of such mouthrinses with different chlorhexidine concentration, when the results clearly suggests that 0.1% chlorhexidine is enough to get anti-plaque and antimicrobial activity, when used in mouthwashes, not been necessary concentrations more high in the mouthrinses

KEYWORDS

Chlorhexidine; mouthwashes; antibacterial; plaque; HPLC

CORRESPONDENCIA

Santos Dumont 964
Santiago, Casilla 1903, Chile.
e-mail address: iyevenes@odontologia.uchile.cl

REFERENCIAS

1. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1974; 1: 143-52
2. Jenkins, S., Addy, M. and Newcombe, R. The effect of a chlorhexidine tooth paste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 59-62
3. Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 2001 Dec; 28 (12): 1127-36
4. Hoyos, D.F., Murray, J.J. and Shaw, L. The effect of chlorhexidine gel on plaque and gingivitis in Children. *Br Dent J* 1977; 142: 366-9
5. Lang, N.P. and Brex, M.C. Chlorhexidine digluconate, an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodontol Res* 1986; 21 (Suppl16): 74-89
6. Addy, M. and Moran, J.M. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol* 2000 1997; 15: 52-4
7. Roberts, W.R. and Addy, M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetylpyridinium chloride and hexetidine; relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295-310
8. Addy, M., Jenkins, S. and Newcombe, R. The effect of some chlorhexidine containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-3
9. Akaho E, Fukumori Y. Studies on adsorption characteristics and mechanism of adsorption of chlorhexidine mainly by carbon black.. *J Pharm Sci* 2001 Sep; 90 (9): 1288-97
10. Emilson, C.G. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 1994; 73 (3): 682-91
11. Twetman, S., Petersson, L.G. Comparison of the efficacy of three different chlorhexidine preparations in decreasing the levels of mutans streptococci in saliva and interdental plaque. *Caries Res* 1998; 32 (2): 113-8
12. Cserna, A., Crist, R.L., Adams, A.B. and Dunning, D.G. Irreversible hydrocolloids: a comparison of antimicrobial efficacy. *J Prosthet Dent* 1994; 71 (4): 387-9
13. Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylenol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am J Dent* 2001 Aug; 14 (4): 233-7
14. Abu Elteen, K.H. and Whittaker, P.A. Effect of sub-inhibitory concentration of chlorhexidine on lipid and sterol composition of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1997; 140 (2): 69-76
15. Claydon, N., Addy, M. The use of plaque area and plaque index to measure the effect of fluoride and chlorhexidine toothpastes on 24-h plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 540-2
16. Bauer, M., Degude, M. and Mailhe, L. Simultaneous determination of chlorhexidine, tetracaine and their degradation products by ion-pair liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; 315: 457-64
17. Bailey, F., Brittain, P.N. and Williamson, B.F. Automated chromatographic determination of chlorhexidine in pharmaceutical preparations. *J Chromatogr* 1975; 109 (2): 305-12
18. Gaffney, M.H., Cooke, M. and Simpsom R. Improve methods for the determination of chlorhexidine in urine. *J Chromatogr* 1984; 306: 303-13

19. Brougham, L.R., Cheng, H.Y. and Pittman, K.A. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine in human serum and urine. *J Chromatogr* 1986; 383 (2): 365-73
20. Lam, Y.W., Chan, D.C., Rodriguez, S.Y., Lintakoon, J.H. and lam, T.H. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of chlorhexidine in saliva. *J Chromatogr* 1993; 612 (1): 166-71
21. Turesky, S., Gilmore, N.D. and Glickman, I. Reduced plaque formation by the chlorometyl analogue of Vitamine C. *J Periodontol* 1970; 41: 41-3
22. Addy, M., Willis, L. and Moran, J. The effect of toothpaste and chlorhexidine rinses on plaque accumulation during a 4 day period. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 89-98
23. Pesonen, T., Holmalahti, J. and Pohjola, J. Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1995; 665 (1): 222-5
24. Quigley, G. and Hein, J. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing . *J Am Dent Assoc* 1962; 65: 26-9
25. Shaw, L. and Murray, J. A new index for measuring extrinsic stains in clinical trials. *Community Dent Oral Epidemiol* 1977; 5: 116-20