

Efecto inhibitorio del triclosán al 0.2% y citrato de zinc al 0.02% sobre bacterias cariogénicas y periodontopatogénicas (*In vitro*)

Adolfo Contreras, R.*
Miryam Astudillo,**
Graciela Barona,***
Fabio Carmona,****
Aristides Baraya,*****

Palabras Claves

Inhibición bacteriana, bacterias cariogénicas, bacterias periodontopáticas, triclosan, citrato de zinc.

RESUMEN

En este estudio se evaluaron las capacidades inhibitorias que poseen los componentes activos triclosán y citrato de zinc sobre bacterias cariogénicas y periodontopáticas *in vitro*. Se cultivaron las siguientes cepas cariogénicas, *Streptococcus gordonii*, *S. sobrinus*, *S. salivarius* y *Actinomyces viscosus* y algunas bacterias periodontopáticas como: *Actinobacillus actinomycesemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella intermedia*, tanto en medios líquidos como sólidos.

Una vez estandarizados los cultivos, un inóculo de 0.5×10^8 bacterias se enfrentó contra diluciones progresivas de los componentes activos de la crema dental. Triclosán desde el 0.6% hasta el 0.0007%; citrato de zinc desde el 0.4% hasta el 0.001% y la mezcla de triclosán al 0.2% con citrato de zinc al 0.002%. Se demostró inhibición para todas las bacterias ensayadas hasta la segunda dilución (1:9) ó 0.0066% ml de triclosán, en algunos casos hubo inhibición hasta la tercera

dilución (1:27) y con mezclas de triclosan al 0.2% y citrato al 0.01% hasta la dilución 1:27.

Algunas bacterias resultaron resistentes a la acción de citrato de zinc en concentraciones por debajo del 0.2%. Cuando este último compuesto se combinó con el triclosán al 0.2%, se presentó una efectiva inhibición del crecimiento bacteriano.

Podemos afirmar que la combinación de los componentes activos triclosán al 0.2% y citrato de zinc al 0.02% incorporados en la crema dental, controlan eficientemente el crecimiento *in vitro* de las principales bacterias implicadas en la etiología de las caries dentales y de las enfermedades periodontales.

INTRODUCCIÓN

La caries dental y la periodontitis son enfermedades que presentan elevadas tasas de prevalencia en la población mundial, puesto que afectan cada año a millones de personas sin distinguir edad, sexo, raza o condición social.

En nuestro país los índices de prevalencia van del 90 al 95% para estas dos patologías, según el último estudio de morbilidad oral¹. La etiología de estas enfermedades ha sido atribuida a los agentes microbianos que colonizan la cavidad oral; algunos géneros poseen la capacidad de metabolizar los carbohidratos de la ingesta y producir ácidos responsables de la caries dental. Como ejemplos, de estas bacterias tenemos: *S. mutans*, *S. millieri*, *S. mitior* y *Lactobacillus*^{2,3}.

* Odontólogo M.Sc. - Profesor Asociado
Escuela de Odontología - Universidad del Valle
** Bacterióloga M.Sc. - Profesora Titular
Departamento de Microbiología - Universidad del Valle
*** Bacterióloga - Profesional Especializada - Sección de
Bacteriología - Departamento de Microbiología
Universidad del Valle
**** Biólogo, M. Sc, Profesor Titular
Departamento de Microbiología - Universidad del Valle
***** Odontólogo - Profesor Asociado
Escuela de Odontología - Universidad del Valle

Otros géneros están relacionados con las periodontitis, porque dichas bacterias poseen factores de virulencia implicados en destrucción tisular, pérdida de tejidos de soporte como hueso, cemento, ligamento, formación de bolsas periodontales, aumento de la movilidad dental y la pérdida de los dientes. Algunos de los géneros considerados como periodontopatógenos son: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spp.*, *Campylobacter rectus* y *espiroquetas*, entre otros¹⁻⁷.

Para controlar la capacidad de daño de estas bacterias sobre los tejidos duros de los dientes, como sobre los tejidos blandos que los circundan, las personas deben establecer medidas rutinarias de higiene oral que signifiquen una disminución de la cantidad de placa, un establecimiento de microorganismos compatibles con la salud bucal y facilitar una activa respuesta inmune del individuo que mantenga el equilibrio entre los procesos de reparación/destrucción tisular.

Las medidas de higiene bucal comprenden el cepillado, el uso de seda dental, limpiadores interproximales, enjuagues antibacterianos, uso de pastas dentales que incorporan diversos compuestos con capacidad de inhibir el crecimiento microbiano y controlar la infección de los tejidos orales⁸⁻¹².

El estudio de algunos de los agentes antimicrobianos incorporados en los dentífricos, los cuales incluyen iones metálicos, enzimas, compuestos naturales, extractos de hierbas, antisépticos, germicidas, fluoruros, entre otros,¹³⁻¹⁷ dan como resultado una interesante área del conocimiento con innumerables aplicaciones en la clínica.

Algunos agentes químicos, como por ejemplo: la clorhexidina, resulta excelente por su capacidad de controlar el crecimiento bacteriano, pero sus efectos colaterales como la pigmentación de los dientes, de las restauraciones, las alteraciones en el sentido del gusto, la sensibilización hacia el compuesto, y el cambio en los patrones de descamación de las mucosas, la hacen poco deseable para ser incorporada en las pastas dentales. No se aconseja tampoco la incorporación de antibióticos por la posibilidad de generar sensibilización en el paciente o crear resistencia bacteriana¹⁶⁻²⁰.

El cloruro de zinc, ofrece sus beneficios como controlador de placa al actuar sinérgicamente con los compuestos de amonio cuaternario como el triclosán, (2,4,4 tricloro hidroxifenil éter). No existe mucha información sobre el mecanismo de acción del compuesto, o estudios que comparen la efectividad en relación con otros agentes antiplaca. Triclosán posee una amplia actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, manifiesta baja toxicidad y posee una mejor actividad antiplaca en presencia de citrato de zinc²¹.

²². En diversos estudios, se ha demostrado efectividad del compuesto, pero algunos resultados muestran variabilidad. En nuestro medio se han efectuado algunos estudios a nivel clínico, correlacionando la acción del compuesto con un incremento de los índices de salud gingival; pero *in vitro*, no se ha probado la acción del mismo. Por esta razón se realizó este estudio cualitativo y cuantitativo, para medir la actividad antimicrobiana del triclosán solo y unido a los demás componentes de un dentífrico comercial, sobre algunas bacterias implicadas en la caries y la periodontitis²⁵⁻²⁷.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Se emplearon 8 cepas bacterianas de referencia del American Type Culture Collection, ATCC. Cuatro implicadas en caries dental y 4 en periodontopatías. Las bacterias cariogénicas fueron: *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. gordonii* y *A. viscosus*.

Estas bacterias, se sembraron en caldo Todd Hewitt, se incubaron por 48 horas a 35°C en aerobiosis y microaerofilia con 5% de CO₂ y se realizaron subcultivos en medios sólidos Agar mitis/salivarius de Gifco Co y en agar suplementado con sangre de cordero al 5%, que facilitaron el crecimiento y la multiplicación bacteriana visualizada por la aparición de colonias identificables macroscópicamente. Los cultivos se trabajaron en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar. Se cultivaron las siguientes bacterias periodontopáticas: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* en condiciones de estricta anaerobiosis (85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y 5% de CO₂), en medios líquidos prerreducidos como tioglicolato con una incubación a 35°C durante 72 horas. Cuando se evidenció el crecimiento por aumento de turbiedad del medio se realizaron subcultivos en agar suplementado con sangre de cordero al 5%, hemina 5mg/ml y menadiona 5µg/ml.

Una vez se observaron en los medios sólidos colonias identificables macroscópicamente, se realizó tinción de Gram, y subcultivo en medio Todd Hewitt para estandarizar un inóculo de 0.5 x 10⁸ bacterias/ml según escala de Mac Farland.

PRUEBA DE EFECTO ANTIMICROBIANO DE LAS SOLUCIONES EN ESTUDIO

Doscientas lambdas del inóculo bacteriano se agregaron a un volumen de 2 mls. de Todd Hewitt, posteriormente a éste se agregó un mililitro de la solución anti-microbiana en estudio. Se realizaron diluciones triples en Todd Hewitt así: 1:3; 1:9; 1:27 hasta 1:81, que se incubaron por 48 horas a 35°C, en atmósfera de 5% de CO₂ para las bacterias aerobias. Las bacterias anaerobias se incubaron en atmósfera con 85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno y 5% de CO₂ a

35°C por 72 horas. El crecimiento bacteriano se verificó por observación de los índices de transmitancia de las soluciones en un espectrofotómetro y se corroboró por subcultivo y visualización de crecimiento bacteriano en medios específicos en condiciones de aerobiosis, y anaerobiosis de acuerdo con los requerimientos bacterianos. En un ensayo adicional se colocaron sensidiscos de papel filtro Whatman en medios sólidos, que contenían 15 µl de la solución a ensayar y un inóculo de 0.5×10^8 bacterias/ml. Se incubaron las cajas durante 24, 48 y 72 horas en las condiciones previamente especificadas y se determinó la restricción del crecimiento bacteriano por la aparición de halos de inhibición en los medios de cultivo alrededor de los sensidiscos. Se cuantificó el diámetro del halo y se informaron los resultados como sensible, si no había crecimiento bacteriano alrededor del disco; parcialmente sensible si había pocas colonias y resistente cuando la sustancia ensayada permitió un crecimiento denso alrededor del sensidisco.

Cada ensayo fue realizado por duplicado modificándose progresivamente las concentraciones de los agentes activos hasta identificar la concentración inhibitoria mínima para cada género bacteriano. Los mismos ensayos se realizaron con un control positivo sanguinario de Viadent y como control negativo se utilizaron los excipientes de la crema dental. Las concentraciones y los componentes que se ensayaron fueron: triclosán al 0.6%, al 0.2%, al 1%, al 0.5%, al 0.01%, hasta el 0.0007%, citrato de zinc desde el 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.02% hasta el 0.005%. Las mezclas según producto terminado de triclosán al 0.2% y citrato de zinc al 0.02%, triclosán al 0.3% y citrato de zinc al 0.02%, en diluciones progresivas 1:3; 1:9; 1:27; 1:81; sanguinarina o benzophenantradina desde 0.75% hasta 0.005% y como control negativo los excipientes de la crema que contienen fluoruro de sodio al 0.22%, polietilén glicol 600 al 3%, sorbitol al 40%, glicerina al 5% y agua estéril al 52%.

Antes de cada ensayo se realizó la prueba de esterilidad a las soluciones y se ajustó el pH entre 6.8 y 7.2.

RESULTADOS

El triclosán inhibió a todas las bacterias ensayadas, tanto en medios sólidos como en medios líquidos en concentraciones desde el 0.6% hasta el 0.05%. Véase tabla No. 1.

La combinación triclosán al 0.2% con citrato de zinc al 0.02% también resultó efectiva contra las bacterias ensayadas al igual que el producto terminado. Esto implica que el triclosán continúa siendo activo a pesar de los surfactantes convencionales que se encuentran en los dentífricos.

Cuando analizamos cada bacteria individualmente encontramos que: *S. sobrinus*, fue moderadamente sensible

a la sanguinarina en concentraciones mayores de 0.15% moderadamente resistente al triclosán en concentraciones por debajo del 0.09%, sensible a la mezcla según producto terminado, lo cual nos demuestra el sinergismo del citrato de zinc incluso en concentraciones < 0.05%.

El *S. salivarius*, resultó resistente a la sanguinarina en concentraciones por debajo del 0.3%, sensible al triclosán hasta concentraciones del 0.05% y sensible a la mezcla según producto terminado. El *S. gordonii*, resultó resistente a la sanguinarina en concentraciones por debajo de 0.3%, sensible a la mezcla triclosán al 0.2% con citrato de zinc al 0.02%. Fue también resistente al citrato solo, en concentraciones por debajo de 0.2%. El *A. viscosus*, resultó ser moderadamente sensible a la sanguinarina por encima del 0.3% y sensible a la mezcla según producto terminado. Los productos continuaron siendo activos a las 24, 48 y 72 horas de iniciados los ensayos. Los excipientes de la crema dental permitieron libremente el crecimiento bacteriano.

El *A. actinomycetemcomitans* resultó ser más sensible que las bacterias Gram positivas, tanto a la mezcla según producto terminado, como al triclosán y citrato de zinc solos.

El *F. nucleatum*, fue moderadamente sensible a la sanguinarina, sensible al triclosán al 0.2% y al producto terminado.

La *P. intermedia* resultó sensible a la sanguinarina, al triclosán al 2%, al citrato de zinc al 2% y al producto terminado.

En los ensayos utilizando sensidiscos se obtuvieron halos de inhibición más pronunciados con la sanguinarina porque dicha sustancia produjo hemólisis en los medios de cultivo dificultando entonces el crecimiento bacteriano. Se produjeron también halos de inhibición con el triclosán pero estos aparecieron tardíamente (a las 48 horas), lo que nos demuestra la baja difusibilidad que poseen estas sustancias en medios densos como el agar sangre.

Cuando se comparó el poder inhibitorio del triclosán al 0.2% contra el poder inhibitorio del citrato de zinc al 0.2%, se encontró que el triclosán es más efectivo para todas las bacterias estudiadas y que en algunos casos la concentración de 0.2% está cerca de la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.). La combinación del triclosán al 0.2% mas citrato de zinc al 0.02%, permitió demostrar un marcado sinergismo entre los compuestos. Véase tabla No. 3.

DISCUSIÓN

Los resultados nos permiten afirmar que los componentes activos triclosán al 2% y citrato de zinc al 0.02% que se incorporan en las formulaciones de la crema dental, inhiben el crecimiento *in vitro* de las siguientes bacterias: *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *A. viscosus*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* y *P. gingivalis*.

Los excipientes en las formulaciones de las cremas dentales no poseen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, pero tampoco ejercen un efecto antagonico sobre los compuestos con actividad antibacteriana.

El promedio de las inhibiciones de la combinación según el producto terminado (triclosán 0.2% más citrato de zinc al 0.02%), es más bajo cuando se compara con los promedios de inhibición del triclosán solo al 0.2% y del citrato de zinc solo al 0.2%, demostrándonos un marcado sinergismo de la combinación, como también se concluyó en estudios previos.

Un dentífrico que contenga triclosán y citrato de zinc puede tener una significativa actividad antiplaca y un efecto netamente benéfico para la salud oral al combinar un método mecánico de eliminación de placa bacteriana (cepillado), con un método químico de control de placa.

Son necesarios estudios más profundos sobre la inhibición que los compuestos activos incorporados en las formulaciones de las cremas dentales puede generar en aislados bacterianos frescos de pacientes con caries y periodontitis en nuestro medio. Resulta también muy interesante investigar sobre los vehículos indispensables para facilitar la difusión de los componentes activos en los ecosistemas orales y el incremento en la sustentividad de los mismos.

Tabla N 1
ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL
DEL TRICLOSAN AL 0.2%

Bacteria	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM ug/ml)
<i>S. sobrinus</i>	0.92
<i>S. salivarius</i>	0.60
<i>S. gordonii</i>	0.75
<i>S. viscosus</i>	0.80
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.23
<i>F. nucleatum</i>	0.74
<i>P. intermedia</i>	0.30
<i>P. gingivalis</i>	0.21

Tabla N 2
ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DEL CITRATO
DE ZINC AL 0.2%

Bacteria	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM ug/ml)
<i>S. sobrinus</i>	1.25
<i>S. salivarius</i>	1.80
<i>S. gordonii</i>	1.55
<i>S. viscosus</i>	1.75
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.90
<i>F. nucleatum</i>	1.86
<i>P. intermedia</i>	0.67
<i>P. gingivalis</i>	0.70

Tabla N 3
ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LA
COMBINACION TRICLOSAN AL 0.2%
Y CITRATO DE ZINC AL 0.02% SOBRE
EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Bacteria	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM ug/ml)
<i>S. sobrinus</i>	0.73
<i>S. salivarius</i>	0.56
<i>S. gordonii</i>	0.45
<i>S. viscosus</i>	0.68
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.15
<i>F. nucleatum</i>	0.70
<i>P. intermedia</i>	0.21
<i>P. gingivalis</i>	0.20

REFERENCIAS

1. MINISTERIO NACIONAL DE SALUD PUBLICA, 1980. Estudio Nacional de Morbilidad Oral.
2. KRASSE B.; EDWARDSSON S.; SVENSSON Y.; TRELL, 1967. Implantation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. Arch Oral Biol; 12:231-236.
3. HAMADA S.; SLADE H.D. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Review, 44: 331 - 384.
4. SLOTS J.; GENCOR J., 1984. Black-pigmented bacteroides species, *Capnocytophaga* and *Actinomyces actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Virulence factors

- in colonization, survival and tissue destruction. *J. Dent Res.* 63: 412-421.
- 5 LISTGARTEN M. A. 1987. Nature of Periodontal diseases: Pathogenic mechanisms. *J. Periodon Res.* 26: 195 - 212.
 - 6 SOCRANSKY S.; HAFFAJEE A. D. 1991. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J. Periodon Res.* 26: 195-212.
 - 7 CONTRERAS A. 1992. Patogénesis de la enfermedad periodontal. *Revista Estomatología.* 2: 79 - 86.
 - 8 GREENFIELD W.; CUCHEL S. J. 1984. The use of an oral rinse and dentifrice as a system for reducing dental plaque. *Compendium of continuing education in dentistry. Supplement.* 5: 582 - 586.
 - 9 SAXTON C.A.; HARRAP G. P.; HOYD A.M. 1986. The effect of dentifrice containing zinc citrate on plaque growth and oral zinc levels. *J. Clin Periodontol.* 3:301 - 306.
 - 10 MURRAY J.J. 1976. Fluorides in caries prevention. *Dental Practitioners Handbook.* Bristol, Jhon Wrigth and son's. 20: 60 - 90.
 - 11 STEPHEN K. W.; RUSSEL J. L.; CREANOR S. L.; BURCHELL C. K. 1988. The effect on monofluoruro phosphate concentration and 0.5% zinc citrate in toothpaste on caries increments. 33 rd. ORCA Congress, abstract 12.
 - 12 BAKER P. J.; COBURN R. A.; GENCO R. J.; EVANS R. T. 1978. In vitro inhibition of microbial growth and plaque formation by surfactans drugs. *J. Perio Res.* 13: 474 - 480.
 - 13 DOLLES U. K.; BONESVALLE P. L. 1978. In vivo retention of chlorhexidine (CH), from a detifrice containing CH and fluoride. (abs.773). *J. Dent research.* 57:268 - 272.
 - 14 HULL P.S. 1980. Chemical inhibition of plaque. *J.Clin Periodontol.* 7:431 - 442.
 - 15 MORAN J.; ADDY M. 1984. The antibacterial properties of some commercially available toothpastes *in vitro.* *British Dental J.* 156: 175-178.
 - 16 GHERSTEN E.; SUATOM B. 1986. Plaque inhibition by hexedine and zinc. *J. Dental Research.* 164: 757-759.
 - 17 SAXTON C.A.; LANE R.M.; VAN DER OUDERA F. 1987. The effects of a zinc salt and non cationic antimicrobial agent on plaque and gingivitis. *J. Clin Periodontol.* 14: 144 - 148.
 - 18 JENKIS S.; ADDY M.; NEWCOMBE. 1989. Toothpaste containing 0.3% and 0.5% Triclosan (I). Effects on 4 day plaque regrowth. *Am. J. Dentistry.* 2:211 - 214.
 - 19 FURIA J.E.; SCHENKEL A. G. 1968. New broad spectrum bacteriostat. *Soap and Chemical Specialities.* Jan 47.
 - 20 CIBA GEIGY Bulletin. 1972. N 2501.
 - 21 GJERMOP.; ROLLA D., 1971. The plaque inhibiting effect of chlorhexidine containing dentifrice. *Scan J. Dent. Res.* 79: 126.
 - 22 ADDY M. 1986. Chlorhexidine compared with other cocally delivered antimicrobials. A short review. *J. Clin Periodontol.* 13: 957 - 964.
 - 23 SAXTON C. A. 1986. The effects of a dentifrice containing zinc citrate and 2, 4,4, Trichloin 2 hidroxiphenil ether. *J. Periodontol.* 57: 555 - 560.
 - 24 STEPHEN K. W.; SAXTON C.A.; JONES C. L. et al. 1990. Control of gingivitis and calculus by a dentifrice containing a zinc salt and triclosan. *J. Periodontol.* 61: 674 - 679.
 - 25 MORAN J.; ADDY M.; NEWCOMBE R. 1989. A comparison of toothpastes containing enzymes or antimicrobial compounds with conventional fluoride toothpaste on the development of plaque and gingivitis. *J. Clin Periodontology.* 16: 295 - 299.
 - 26 JENKINS J.; ADDY M.; NEWCOMBE R. 1989. Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth (II). Triclosan with and without zinc citrate formulations. *J. Clin Periodontol.* 16: 385 - 387.
 - 27 ADDY M.; JENKINS J.; NEWCOMBE R. 1990. The effect of triclosan stannous fluoride and chlorhexidine products on plaque regrowth over a 4 day period. *J. Clin. Periodontol.* 19:693 - 697.