

Actividad antibacteriana in vitro de un enjuague bucal a base de oxígeno comparado con digluconato de clorhexidina frente al *Fusobacterium nucleatum*

In vitro antibacterial activity of an oxygen-based mouthwash compared to chlorhexidine digluconate against *Fusobacterium nucleatum*

Atividade antibacteriana in vitro de um enxaguante bucal à base de oxigênio em comparação com o digluconato de clorexidina contra *Fusobacterium nucleatum*

Recibido: 25/01/2026 | Revisado: 08/03/2026 | Aceptado: 09/03/2026 | Publicado: 13/03/2026

Milena de la C. Sarmiento Balber

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5773-6176>

Independent Researcher, United States

E-mail: sarmientomilena636@gmail.com

Alberto Núñez Fidalgo

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1940-0082>

Independent Researcher, United States

E-mail: betto9118@gmail.com

José A. Lastres Hernández

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8017-8645>

Independent Researcher, United States

E-mail: joselastr3@gmail.com

Wiliam A. Ramirez Mesias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9854-1010>

Universidad de San Martín de Porres, Perú

E-mail: wiliamramirez15@gmail.com

Resumen

Objetivo: Comparar la actividad antibacteriana a nivel in vitro del enjuague de digluconato de clorhexidina y oxígeno frente al *Fusobacterium nucleatum*. **Materiales y métodos:** El efecto antibacteriano fue investigado mediante la prueba microbiológica de difusión en agar de los enjuagues bucales: enjuague de oxígeno blue®m al 100 % (B1), enjuague de oxígeno blue®m al 75 % (B2), enjuague de oxígeno blue®m al 50 % (B3) y solución de digluconato de clorhexidina al 0,12 % de Perio-AID al 100 % (C1) frente a cepas ATCC 25586 del *Fusobacterium nucleatum*. **Resultados:** Se encontró que blue®m, en dosis del 100 % y del 75 %, es similar a la clorhexidina. Sin embargo, blue®m a una concentración del 50% mostró un halo de inhibición menor en comparación con la clorhexidina ($p = 0,024$). **Conclusiones:** Blue®m a concentraciones más altas proporcionó un halo inhibitor de *Fusobacterium nucleatum* similar al digluconato de clorhexidina, mientras que blue®m a una concentración más baja presentó un halo de inhibición bacteriana menor en comparación con la clorhexidina.

Palabras clave: *Fusobacterium nucleatum*; Enjuague bucal; Clorhexidina; Oxígeno.

Abstract

Objective: To compare the in vitro antibacterial activity of chlorhexidine digluconate mouthwash and an oxygen-based mouthwash against *Fusobacterium nucleatum*. **Materials and Methods:** The antibacterial effect was evaluated using the agar diffusion microbiological assay with the following mouthwashes: blue®m oxygen mouthwash at 100% (B1), blue®m oxygen mouthwash at 75% (B2), blue®m oxygen mouthwash at 50% (B3), and a 0.12% chlorhexidine digluconate solution from Perio-AID at 100% (C1), tested against *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 strains. **Results:** The findings showed that blue®m at concentrations of 100% and 75% exhibited antibacterial activity comparable to chlorhexidine. However, blue®m at a concentration of 50% demonstrated a smaller inhibition zone compared with chlorhexidine ($p = 0.024$). **Conclusions:** Higher concentrations of blue®m produced an inhibitory halo against *Fusobacterium nucleatum* similar to that observed with chlorhexidine digluconate, whereas lower concentrations resulted in reduced antibacterial inhibition when compared with chlorhexidine.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*; Mouthwash; Chlorhexidine; Oxygen.

Resumo

Objetivo: Comparar a atividade antibacteriana in vitro de um enxaguante bucal à base de digluconato de clorexidina e de um enxaguante bucal à base de oxigênio contra *Fusobacterium nucleatum*. **Materiais e Métodos:** O efeito

antibacteriano foi avaliado por meio do ensaio microbiológico de difusão em ágar utilizando os seguintes enxaguantes bucais: enxaguante blue®m com oxigênio a 100% (B1), blue®m a 75% (B2), blue®m a 50% (B3) e solução de digluconato de clorexidina a 0,12% de Perio-AID a 100% (C1), testados contra cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Resultados: Os resultados demonstraram que o blue®m nas concentrações de 100% e 75% apresentou atividade antibacteriana semelhante à da clorexidina. No entanto, o blue®m na concentração de 50% apresentou uma zona de inibição menor em comparação com a clorexidina ($p = 0,024$). Conclusões: Concentrações mais elevadas de blue®m produziram um halo de inibição contra *Fusobacterium nucleatum* semelhante ao observado com o digluconato de clorexidina, enquanto concentrações mais baixas apresentaram menor efeito antibacteriano em comparação com a clorexidina.

Palavras-chave: *Fusobacterium nucleatum*; Enxaguante bucal; Clorexidina; Oxigênio.

1. Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de naturaleza multifactorial asociada a una alteración de la biopelícula dental, lo que provoca el deterioro progresivo de las estructuras periodontales que sostienen los dientes (James et al., 2017). Algunos trastornos y afecciones sistémicas pueden afectar al periodonto y causar pérdida de inserción periodontal y hueso alveolar, influyendo en la inflamación periodontal o mediante mecanismos distintos a la periodontitis, como factores genéticos, inmunológicos o el uso de determinados medicamentos (Feres et al., 2018).

El tratamiento de la periodontitis se basa en procedimientos periodontales básicos y en el mantenimiento correspondiente; en casos específicos puede requerir la administración sistémica de amoxicilina y metronidazol, así como el uso tópico de digluconato de clorhexidina (James et al., 2017; Feres et al., 2018). Esto es necesario debido a la resistencia y complejidad del biofilm periodontal, en el que participan bacterias periodontopatógenas como *Fusobacterium nucleatum* (Mysak et al., 2014). Esta bacteria anaerobia gram negativa actúa como un microorganismo clave en la organización del biofilm subgingival y presenta diversos factores de virulencia capaces de inducir una intensa destrucción tisular (Mysak et al., 2014).

El oxígeno es un nutriente esencial para el metabolismo celular, especialmente para la producción de energía. Participa en múltiples procesos biológicos, como la eliminación oxidativa de bacterias, la reepitelización, la angiogénesis y la síntesis de colágeno (Knighton et al., 1983; Eisenbud, 2012). No obstante, existe una paradoja fisiológica, ya que el oxígeno es indispensable para la vida celular, pero puede inducir daño celular cuando se expone a concentraciones elevadas (Osellame et al., 2012).

Con base en estos principios, se desarrollaron productos odontológicos a base de oxígeno activo, como el enjuague bucal blue®m, que contiene oxígeno activo estabilizado, lactoferrina y xilitol (Makeeva & Tambovtseva, 2014). Estudios clínicos han demostrado que los productos con oxígeno activo presentan efectos beneficiosos en la reducción de la inflamación gingival y del biofilm supragingival (Cunha et al., 2019), así como una eficacia antiplaca comparable a la de agentes convencionales (Cunha et al., 2019).

Asimismo, la liberación controlada de oxígeno ha demostrado efectos positivos en la cicatrización de heridas crónicas y en el control de infecciones locales (Kaufman et al., 2018; Yu et al., 2016). La eficacia antimicrobiana de estos productos se debe en gran medida a la producción de especies reactivas de oxígeno, moléculas con elevado potencial oxidativo que afectan la estabilidad estructural de las bacterias e inhiben su crecimiento (ROS), las cuales poseen una potente actividad antimicrobiana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, y dificultan la formación de biopelículas (Dryden et al., 2017; Dryden, 2018a; Dryden, 2018b).

Considerando la limitada evidencia científica sobre el uso de oxígeno activo como agente antimicrobiano tópico en periodoncia, el presente estudio tuvo como objetivo comparar la actividad antibacteriana in vitro de un enjuague bucal a base de oxígeno activo y del digluconato de clorhexidina frente a *Fusobacterium nucleatum*.

2. Metodología

El diseño de este proyecto de investigación fue de tipo experimental in vitro, en un estudio de laboratorio, de carácter cuantitativo (Pereira et al., 2018), utilizando estadística descriptiva simple con clases de datos, promedio, desviación estándar, valor mínimo, valor máximo y valores de frecuencia relativa porcentual (Shitsuka et al., 2014) con análisis estadístico (Costa Neto & Bekman, 2009), y se solicitaron autorizaciones y coordinaciones al laboratorio High Technology Laboratory Certificate S.A.C. para la evaluación de la actividad antibacteriana de enjuagues bucales experimentales. Se adquirieron las cepas ATCC 25586 del *Fusobacterium nucleatum* por la empresa Gen Lab del Perú.

En la actividad antibacteriana se determinó por el ensayo de difusión en agar $n = 5$ por grupo, fueron inoculados 20 mL de medio de cultivo Müller-Hinton (Oxoid Brazil Ltd) con *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586). Con una pipeta, se inocularon 0,2 mL de bacterias en 5 mL de caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) (Oxoid Brazil Ltd). El tubo de ensayo que contenía el medio de cultivo inoculado se agitó en vórtex hasta homogeneizar. El BHI inoculado se ajustó a una turbidez de 0,5 de la escala de McFarland. Seguido, se inocularon 200 μ L de este caldo bacteriano sobre la superficie del agar y se extendieron uniformemente utilizando un asa de Drigalski estéril, para continuar estimulando su crecimiento y se procedió a incubar por 24 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis (Jarra de anaerobiosis - Gaspak 100 - suplementando con N₂ al 80 %).

Para evaluar y comparar los efectos del oxígeno sobre *Fusobacterium nucleatum*, se evaluaron cinco placas con muestras de blue®m y digluconato de clorhexidina al 0,12 %. Para ello, se prepararon 5 discos de papel de filtro estéril de 5 mm en los pocillos al interior de placas petri con 5 mm de diámetro por grupo, seguido se impregnaron 50 μ L con las soluciones descritas en la Tabla 1 durante 60 segundos.

La Tabla 1 a continuación presenta los materiales del grupo de estudio:

Tabla 1 - Materiales del grupo de estudio.

Grupo	Materiales / Composición	Manufactura
Enjuague bucal Perio AID® - Dentaïd	Digluconato de Clorhexidina 0,12 % y 0,05 % de Cloruro de Cetilpiridinio (CPC)	Madrid - España
Enjuague bucal blue®m	Oxígeno activo 0.003%, Lactoferrina, Xilitol	Amsterdam, Países Bajos

Fuente: Datos de la investigación (2026).

Con unas pinzas, los discos se depositaron con una ligera presión sobre la placa Petri, sobre la superficie del agar, de forma equidistante, como se determinó en la zona posterior de la placa, en condiciones asépticas. Una placa se dividió en partes iguales y se aplicó el enjuague blue®m en tres concentraciones diferentes (B1 100 %, B2 75 % y B3 50 %), además de digluconato de clorhexidina al 0,12% al 100% (C1) y agua destilada como control negativo (C2). Se repitieron 5 placas idénticas para las mismas bacterias. Esto se realizó en la zona posterior de la placa y en condiciones asépticas.

Después del experimento, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la difusión de las sustancias antes del desarrollo microbiano.

Después de este procedimiento, las placas se mantuvieron en condiciones de incubación a 37 °C durante 72 horas. Al final de este período, dos examinadores diferentes midieron el diámetro en los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos de papel, promovidos por las soluciones analizadas, y lo registraron en milímetros (mm) con un pie de rey digital. Para ello, se utilizaron cuatro mediciones perpendiculares entre sí, obteniendo el promedio de sus tamaños.

Análisis estadístico

Para evaluar la fiabilidad de los datos obtenidos entre los examinadores, se realizó la prueba del coeficiente de correlación intraclase (CCI). El procesamiento estadístico de la información se efectuó mediante el software SPSS versión 21.0, adoptando un nivel de significancia de 0,05. La prueba de normalidad se comprobó por la prueba de Shapiro–Wilk, mientras que las diferencias entre los grupos de enjuagues se efectuaron utilizando las pruebas no paramétricas de Kruskal–Wallis y Mann–Whitney.

3. Resultados y Discusión

La actividad antibacteriana in vitro frente a *Fusobacterium nucleatum* se observó en todos los grupos experimentales evaluados. El grupo correspondiente al enjuague blue®m al 50 % presentó un menor halo de inhibición bacteriana en comparación con los grupos blue®m al 100 %, blue®m al 75 % y el grupo control positivo con digluconato de clorhexidina. La concordancia entre los examinadores fue excelente, con un coeficiente de correlación intraclase (CCI) de 0,901.

En las siguientes líneas, la Tabla 2 presenta datos sobre la medición del diámetro de la zona de inhibición del enjuague bucal:

Tabla 2 - Resultados de la medición del diámetro de la zona de inhibición del enjuague bucal.

Enjuagues bucales	Media	Valor mínimo	Valor máximo	Valor p
B1: Enjuague bucal blue®m al 100 %	11.93 ± 0.8	11.04	12.55	
B2: Enjuague bucal blue®m al 75 %	11.05 ± 1.2	10.08	11.28	0.041
B3: Enjuague bucal blue®m al 50 %	8.58 ± 1.9	8.04	10.02	
C1: Enjuague bucal Perio-AID®	12.46 ± 1.1	11.08	13.22	
C2: Agua destilada pura	0.00 ± 0.0	0.00	0.00	

Media ± desviación estándar del diámetro de zona de inhibición.

Prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0,041$. Prueba de Mann-Whitney, $p = 0,024$.

Fuente: Autores.

Los resultados demostraron que el enjuague blue®m a concentraciones del 100 % y del 75 % presentó una actividad antibacteriana comparable a la del digluconato de clorhexidina; sin embargo, la concentración al 50 % mostró un halo de inhibición significativamente menor en comparación con la clorhexidina ($p = 0,024$).

El digluconato de clorhexidina es considerado el estándar de referencia en antisepsia oral debido a su amplia acción antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas (James et al., 2017; Sachdeva et al., 2018). Sin embargo, el empleo prolongado de este agente se ha vinculado con efectos secundarios, tales como pigmentación dental, modificaciones en la percepción gustativa y descamación de la mucosa oral, lo que puede reducir su aceptación en la práctica odontológica (Sachdeva et al., 2018; Meyer et al., 2007; Zanatta & Rosing, 2007).

En este contexto, los productos basados en oxígeno activo han surgido como una alternativa potencial con menor riesgo de efectos secundarios. Estudios previos han demostrado que el oxígeno participa activamente en mecanismos celulares implicados en la cicatrización, como la angiogénesis y la regeneración tisular (Knighton et al., 1983; Eisenbud, 2012; Kaufman et al., 2018; Yu et al., 2016). Además, la acción antimicrobiana mediada por especies reactivas de oxígeno representa un mecanismo inespecífico que reduce la probabilidad de desarrollo de resistencia bacteriana (Dryden et al., 2017; Dryden, 2018a; Dryden, 2018b).

Los resultados del presente estudio mostraron que el enjuague blue®m a concentraciones del 100 % y del 75 % presentó una actividad antibacteriana in vitro comparable a la del digluconato de clorhexidina frente a *Fusobacterium nucleatum*. Este hallazgo es relevante considerando el papel central de *F. nucleatum* en la organización del biofilm periodontal y su implicancia en la progresión de la periodontitis (Mysak et al., 2014; Lamont et al., 2018).

Por el contrario, la reducción significativa de la actividad antibacteriana observada con la concentración al 50 % sugiere la existencia de una concentración mínima efectiva, por debajo de la cual la generación de especies reactivas de oxígeno no resulta suficiente para ejercer un efecto antimicrobiano adecuado (Dryden et al., 2017; Dryden, 2018a; Dryden, 2018b).

Entre las limitaciones del estudio se encuentra la evaluación de una sola especie bacteriana, cuando la periodontitis es una enfermedad de etiología polimicrobiana (Lamont et al., 2018). Asimismo, no se evaluó la citotoxicidad ni la sustentividad del enjuague, aspectos relevantes para su aplicación clínica futura.

4. Conclusión

El enjuague bucal blue®m a concentraciones del 100 % y del 75 % mostró una actividad antibacteriana in vitro comparable a la del digluconato de clorhexidina frente a *Fusobacterium nucleatum*, mientras que concentraciones más bajas presentaron una menor eficacia antimicrobiana. Estos resultados respaldan el potencial del oxígeno activo como agente antimicrobiano tópico en periodoncia y abren una línea de investigación con proyección clínica futura.

Agradecimientos

Los autores agradecen al High Technology Laboratory Certificate S.A.C. de Lima, Perú, por las facilidades brindadas para la realización de los ensayos microbiológicos, y a Gen Lab del Perú por el suministro de las cepas bacterianas ATCC.

Referencias

- Costa Neto, P. L. O. & Bekman, O. R. (2009). *Análise estatística da decisão*. Editora Blucher.
- Cunha, E. J., Auersvald, C. M., Deliberador, T. M., Gonzaga, C. C., Esteban Florez, F. L., Correr, G. M. et al. (2019). Effects of active oxygen toothpaste in supragingival biofilm reduction: a randomized controlled clinical trial. *Int J Dent*. 2019:3938214. doi:10.1155/2019/3938214.
- Dryden, M., Cooke, J., Salib, R., Holding, R., Pender, S. L. F. & Brooks, J. (2017). Hot topics in reactive oxygen therapy: antimicrobial and immunological mechanisms, safety and clinical applications. *J Glob Antimicrob Resist*. 8:194-198. doi:10.1016/j.jgar.2016.12.012.
- Dryden, M. (2018a). Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *Int J Antimicrob Agents*. 51(3):299-303. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029.
- Dryden, M. (2018b). Reactive oxygen therapy: a novel therapy in soft tissue infection. *Curr Opin Infect Dis*. 30(2):143-9. doi:10.1097/QCO.0000000000000350.
- Eisenbud, D. E. (2012). Oxygen in wound healing: nutrient, antibiotic, signaling molecule, and therapeutic agent. *Clin Plast Surg*. 39(3):293-310. doi:10.1016/j.cps.2012.05.001.
- Feres, M., Retamal-Valdes, B., Mestnik, M. J., de Figueiredo, L. C., Faveri, M., Duarte, P. M. et al. (2018). The ideal time of systemic metronidazole and amoxicillin administration in the treatment of severe periodontitis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 19:201. doi:10.1186/s13063-018-2540-8.
- James, P., Worthington, H. V., Parnell, C., Harding, M., Lamont, T., Cheung, A. et al. (2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev*. 3:CD008676. doi:10.1002/14651858.CD008676.pub2.
- Kaufman, H., Gurevich, M., Tamir, E., Keren, E., Alexander, L. & Hayes, P. (2018). Topical oxygen therapy stimulates healing in difficult, chronic wounds: a tertiary centre experience. *J Wound Care*. 27(7):426-433. doi:10.12968/jowc.2018.27.7.426.
- Knighton, D. R., Hunt, T. K., Scheuenstuhl, H., Halliday, B. J., Werb, Z. & Banda, M. J. (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science*. 221(4617):1283-5. doi:10.1126/science.6612342.
- Lamont, R. J., Koo, H. & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 16(12):745-59. doi:10.1038/s41579-018-0089-x.

- Makeeva, I. M. & Tambovtseva, N. V. (2014). Applying toothpaste and mouthwash BLUEM in complex oral care in patients with coronary heart disease. *Stomatologiya*. 93(3):18-20.
- Meyer, A. C. A. et al. (2007). Avaliação clínica e microbiológica do uso de um creme dental contendo clorexidina a 1%. *Rev Odontol UNESP*. 36(3):255-60.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T. et al. (2014). Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*. 2014:476068. doi:10.1155/2014/476068.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 26(6):711-723. doi:10.1016/j.beem.2012.05.003.
- Pereira A. S. et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.
- Sachdeva, S., Grover, V., Malhotra, R., Kapoor, A. & Mohanty, K. (2018). Comparison of clinical effectiveness of single and multiple applications of 1% chlorhexidine varnish (Cervitec Plus) along with scaling and root planing in patients with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 22(6):523-528. doi:10.4103/jisp.jisp_252_18.
- Shitsuka, R. et al. (2014). *Matemática fundamental para tecnologia*. (2ed). Editora Érica.
- Yu, J., Lu, S., McLaren, A. M., Perry, J. A. & Cross, K. M. (2016). Topical oxygen therapy results in complete wound healing in diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*. 24(6):1066-1072. doi:10.1111/wrr.12490.
- Zanatta, F. B. & Rosing, C. K. (2007). Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A*. 1:35-43.