

Acción antibacteriana *in vitro* de dentífricos sin flúor frente a cepas de *Streptococcus mutans*

In vitro antibacterial activity of fluoride-free toothpastes against *Streptococcus mutans* strains

Sally Thressy, Sanchez Ballena^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8217-069X>

Mario César Elías Podestá² <https://orcid.org/0000-0003-1601-7627>

César, Arellano Sacramento³ <https://orcid.org/0000-0001-5958-8118>

Montserrat Diéguez Pérez⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1285-1665>

¹Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima-Perú

²Universidad Continental. Huancayo-Perú

³Universidad Norbert Wiener. Lima, Perú.

⁴Universidad Complutense de Madrid. Universidad Europea de Madrid. España.

*Autor para la correspondencia: sallsanc@ucm.es

RESUMEN

Introducción: Los dentífricos con ingredientes activos previenen la caries dental en niños.

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de tres dentífricos sin flúor y dos soluciones control frente a cepas estándares de *Streptococcus mutans*.

Métodos: Se realizó un estudio transversal, prospectivo y experimental a doble ciego. Se utilizó agar tripticasa de soya con el método de difusión a 37 °C durante 24 h. Se observó el tamaño de los halos de crecimiento inhibitorio en cada grupo. El análisis de los datos se realizó con el software SPSS15, mediante pruebas estadísticas de corroboración de distribución gaussiana de Shapiro–Wilk, prueba de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney.

Resultados: El diámetro de inhibición en gluconato de clorhexidina al 0,12 % fue de 26,69 mm (\pm 1,85), en el agua destilada de 6 mm (\pm 0) y para las pastas dentífricas de 6 mm (\pm 0) y 22,93 mm (\pm 3,39). Al comparar los diámetros obtenidos por la acción del gluconato de

clorhexidina 0,12 % y del agua destilada con los dentífricos libre de flúor, sólo en uno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Conclusiones: No todos los dentífricos para la higiene bucal del bebé estudiados presentan actividad antibacteriana frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Palabras clave: dentífricos; agentes antibacteriales; *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Introduction: Toothpastes with active ingredients prevent dental caries in children.

Objective: Determine the *in vitro* antibacterial activity of three fluoride-free toothpastes and two control solutions against standard *Streptococcus mutans* strains.

Methods: A prospective cross-sectional experimental double-blind study was conducted. Trypticase soy agar was used applying the diffusion method at 37 °C for 24 h. The size of the growth inhibition haloes of each group was examined. Data analysis was based on SPSS15 software, using Shapiro-Wilk Gaussian distribution corroboration statistical tests, and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Results: Inhibition diameter was 26.69 mm (± 1.85) for 0.12 % chlorhexidine gluconate, 6 mm (± 0) for distilled water, and 6 mm (± 0) and 22.93 mm (± 3.39) for the toothpastes. Comparison of the diameters obtained by the action of 0.12 % chlorhexidine gluconate and distilled water with the fluoride-free toothpastes revealed statistically significant differences in only one of the cases ($p < 0.05$).

Conclusions: Not all the baby toothpastes studied display antibacterial activity against the *Streptococcus mutans* strain ATCC 25175.

Key words: toothpastes; antibacterial agents, *Streptococcus mutans*.

Recibido: 02/09/18.

Aceptado: 26/01/19.

INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal del recién nacido es prácticamente estéril, unas horas después del nacimiento es colonizada por microorganismos facultativos y aerobios, siendo la mayoría de estas bacterias transitorias. Aunque el primer medio de infección es el canal del parto, la

diversidad y cantidad bacteriana es debido a factores como transmisibilidad, el inicio de la ingesta de alimentos, la condición de vida, número de hermanos, presencia de mascota en el hogar entre otros factores, pero los colonizadores bucales exitosos provienen de saliva exógena y pocos meses, en la mayoría de los casos, la boca tendrá una microbiota oral reconocible. Y es con la erupción de los dientes temporales que se da lugar a la colonización de gérmenes minuciosamente adaptados a este medio.^(1,2,3,4) Las bacterias orales como *Streptococcus* y *Actinomyces* comprenden una proporción significativa de los microorganismos de la placa bacteriana. Según algunos autores la diversidad de la microbiota oral en bebés de 6, 18 y 24 meses de edad es amplia, identificándose 397 géneros bacterianos y 1 033 especies, siendo los géneros más predominantes *Streptococcus*, *Veillonella* y *Neisseria*.⁽²⁾ Esta diversidad bacteriana implica que los dientes estén sometidos a condiciones extremadamente dinámicas, provocando eventuales modificaciones minerales.⁽⁵⁾

Desde hace algunos años, se promueve la incorporación de xilitol a los dentífricos fluorados para la prevención y control de la caries dental. Debido al carácter no cariogénico del xilitol y otros polioles, su uso fue respaldado por la Academia Americana de Odontología Pediátrica.⁽⁶⁾ En base a ello surgió la necesidad de conocer el efecto sobre la salud, por ello Ripley y otros realizaron una revisión sistemática con la evidencia científica disponible hasta el 2014, quienes concluyeron que en base a estudios de muy baja calidad, los dentífricos fluorado con xilitol son más eficaces que el dentífrico fluorado (sin xilitol) en la prevención de la caries dental en niños; sin embargo, debido a la calidad de los estudios estas conclusiones no son determinantes y se debe seguir realizando investigación al respecto.⁽⁷⁾

No obstante, es importante señalar que en esta revisión sistemática no incluyeron a dentífricos no fluorados con xilitol, los cuales son comercializados desde hace varios años en muchos países para la higiene bucal de niños menores a 3 años. En un estudio de campo preliminar a la presente investigación se corroboró que se comercializan dentífricos sin flúor con extracto de caléndula como componente activo, ambos recomendados para la higiene de bebés.

En relación con el extracto de caléndula tiene un efecto antioxidante, antibacteriano y antiinflamatorio en el huésped. Posee un pH de 5,43 e inhibe el crecimiento bacteriano del *Streptococcus mutans* a una concentración mínima de 3,12 µg/mL y es bactericida a 6,25 µg/mL, además la caléndula sin dilución tiene letalidad a los 10 min de expuesto.⁽⁸⁾ Su acción antibacteriana se fundamenta en la reducción de la adherencia de microorganismos.

A pesar de ello, su efecto es discutido cuando está asociado con un dentífrico a enjuagues al 15 % y 20 % de caléndula.^(8,9,10,11) En todos los casos informan menor acción de la caléndula en comparación con la clorhexidina 0,12 %.^(9,10,11)

Sobre la base de lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de tres dentífricos sin flúor y dos soluciones control frente a cepas estándares de *Streptococcus mutans*.

MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, prospectivo y experimental *in vitro*. Para determinar el tamaño muestral se utilizó el Software Epidat v.4.0 en su módulo de muestreo, cálculo de tamaño de muestra para comparación de medias de grupos independientes, con un nivel de confianza de 95 % y poder de prueba de 80 % tomando como referencia datos precedentes;⁽¹²⁾ el tamaño mínimo resultó de 17 pocillos por grupo; para salvaguardar este tamaño mínimo se adicionó 3 pocillos, haciendo un total de 20 pocillos por grupo, al ser considerados 5 grupos resultaron finalmente 100 pocillos.

Los criterios de inclusión fueron placas Petri con cepas estandarizada ATCC de *Streptococcus mutans* 25175 y como criterios de exclusión se consideró aquellas placas contaminadas, muestras leídas después del tiempo establecido y más de tres repicajes de la siembra de la cepa. La ejecución del estudio fue realizada en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - UNMSM (Lima-Perú).

Las variables estudiadas fueron actividad antibacteriana (medio en milímetros de halo de inhibición) en dentífricos no fluorados (con xilitol y extracto de caléndula), agua destilada y CHX al 0,12 %.

La cepa bacteriana fue adquirida por la UNMSM del laboratorio Microbiologics©, EE. UU. Por ello para la realización del presente estudio no se expuso a niños a sustancias químicas ni se alteró la naturaleza de la cepa liofilizada del microorganismo.

Los materiales y equipos que se emplearon en la investigación fueron placas Petri, asa de kolle, mechero, micropipetas, hisopos, gradillas, tubos de ensayo con tapa hermética, jeringas hipodérmicas, calibrador digital, papel filtro, marcador indeleble, la cepa estandarizada ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*, autoclave, jarra de anaerobiosis, refrigeradora, fichas para la recolección de datos, dos pastas dentífricas no fluoradas con

xilitol (Denture BB[®] y Dentito Baby[®]), un dentífrico con extracto de caléndula (Pasta dentífrica para bebés[®]) y dos soluciones control (agua destilada y digluconato de clorhexidina 0,12 %). De acuerdo con el orden de mención de los dentífricos se les asignó las siguientes siglas: GX1, GX2 y GC según correspondió (cuadro).

Cuadro - Composición de los dentífricos para bebés

Pastas	Ingredientes
GX1	Xilitol, glicerina, sorbitol, agua purificada, sílica hidratada, dióxido de silicio, goma xantan, pectina, lactato de calcio, sabor frutti frutti, colorante rojo y conservantes
GX2	Xilitol, glicerina, sorbitol, agua, sílica, goma celulosa, <i>Chamomilla recutita</i> , benzoato de sodio, lauril sarcosinato de sodio y sucralosa
GC	Extracto de Caléndula, glicerina, agua, ácido silícico, aceite de hinojo, aceite de hierba buena, aesculina y aceites esenciales naturales

GX1: Denture BB[®]; GX2: Dentito Baby[®]; GC: Gel dentífrico para bebés[®].

Para la recuperación de la viabilidad de las cepas, fue necesario activar la cepa con un caldo de tioglicolato e incubadas a 37 °C durante 24-48 h. Se realizó repicaje en medio de agar tripticasa de soya bajo las condiciones previamente mencionadas durante 48 h.

Previo al desarrollo de la investigación, fue necesario realizar un estudio piloto para estandarizar las dosificaciones de los dentífricos y soluciones control. Se estableció una dosis de 50 mL de dentífricos (GX1, GX2 y GC) y 20 mL para las soluciones control (agua destilada y digluconato de clorhexidina 0,12 %) para cada pocillo. En condiciones estériles, se trasladó el contenido de los dentífricos a jeringas de tuberculina de única presentación y rotulados con números asignados al azar; ello permitió el desconocimiento del contenido de estas para su aplicación en la placa Petri (primer ciego).

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó el protocolo de test de susceptibilidad antimicrobiana establecida por Clinical and Laboratory Stándar Institute.⁽¹³⁾ Previo a la siembra se comparó el grado de turbidez de la escala McFarland 0.5 con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 contenido en tubo de ensayo. Se aplicó el método de siembra en estrías en cuatro direcciones, y se escogió el método de difusión en pocillo, para la colocación de los geles dentífricos y soluciones controles. El tamaño de los pocillos fue de 6 mm en todos los casos. Estas placas fueron rotuladas y se colocaron en una jarra de anaerobiosis con el método de vela, luego fue llevado a la estufa a 37 °C durante 48 h. Posteriormente se realizó la lectura y registro de los halos de inhibición para su procesamiento y se consideró inactividad antimicrobiana cuando este era menor o igual que 6 mm, estimándose la actividad antibacteriana cuando el halo era superior a 6 mm de

diámetro.

El análisis estadístico cegado se realizó con el software SPSS versión 15. Se hallaron los promedios de la desviación típica, valor mínimo y máximo de las variables continuas mediante análisis descriptivo para datos cuantitativos. Para obtener los resultados de actividad antibacteriana de los geles dentífricos y sus controles se comparó el tamaño de los halos de crecimiento inhibitorio de cada grupo. Se realizaron pruebas estadísticas de corroboración de distribución gaussiana de Shapiro-Wilk, posteriormente se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples y de Mann-Whitney para comparaciones individuales (Fig.).

En el presente estudio, no intervinieron seres humanos como sujetos de estudio.

RESULTADOS

En la tabla 1 y figura se muestra la medida de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano de los geles dentífricos GX1, GC, agua destilada y CHX. El análisis de las variables GX1, GC y el control negativo mostraron datos similares en sus valores mínimo y máximo, un tamaño del halo de inhibición de 6 mm y variabilidad nula. En contraposición a este hecho las variables GX2 y CHX muestran mayor tamaño del halo de inhibición del crecimiento antibacteriano, siendo este de 22,93 mm y 26,69 mm, respectivamente.

Tabla 1 - Análisis descriptivo de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano de las pastas para bebés

Pastas	Componente activo	Zona de inhibición de las pastas sobre SM, diámetro en milímetro				
		Tamaño muestral	Valor mínimo (mm)	Valor máximo (mm)	Media (mm)	Desviación estándar (mm)
GX1	Xilitol	20	6	6	6	0
GX2	Xilitol	20	19	28,5	22,93	3,93
GC	Caléndula	20	6	6	6	0
Agua destilada	H ₂ O	20	6	6	6	0
CHX 0,12 %	CHX 0,12 %	20	24	30	26,69	1,85

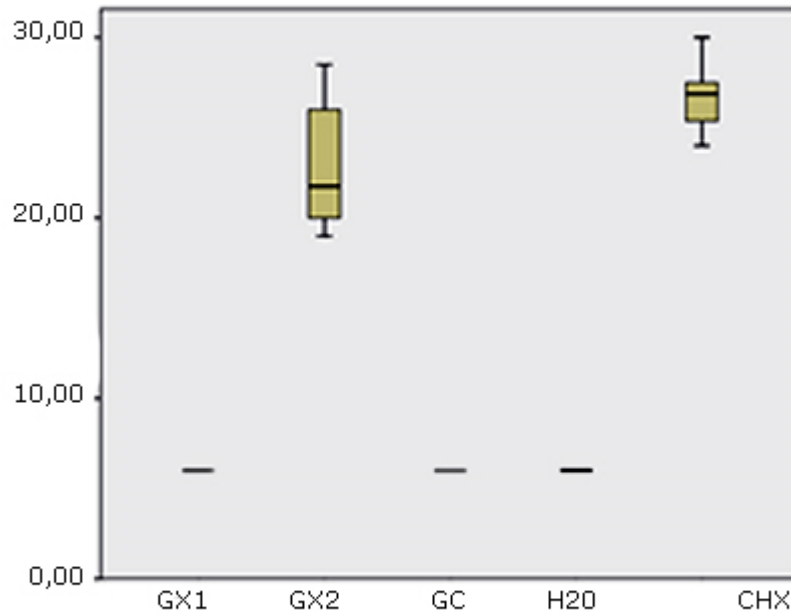


Fig - Box plot de los grupos de estudio.

El análisis descriptivo constató que todos los grupos estudiados presentaron valores constantes en los 20 pocillos.

Se corroboró la ausencia de distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk $p > 0,05$. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis, el estadístico para observar diferencias en el promedio de los halos de inhibición del crecimiento antibacteriano de todos los grupos. Al menos uno de ellos fue diferente, siendo $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Para determinar si había diferencia, se realizaron comparaciones entre grupos (Mann-Whitney), a los que presentaban valores superiores al grupo control negativo (tabla 2).

Tabla 2 - Comparaciones múltiples de las pastas frente a los controles

Grupo (i)	Grupo (j)	Grupo(i) Grupo(j)	Valor p
GX1	CHX	GX1/CHX	0,000*
GX2		GX2/CHX	0,001*
GC		GC/CHX	0,000*
GX1	H ₂ O	GX1/H ₂ O	1,000
GX2		GX2/ H ₂ O	0,000*
GC		GC/ H ₂ O	1,000

*Diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar los halos de inhibición de los dentífricos con los controles, se observó diferencias significativas en la medición del halo de inhibición de crecimiento antibacteriano, entre GX2 y el control negativo ($p < 0,05$) y con el control positivo CHX ($p < 0,05$). Encontrando que tuvo mayor promedio en la medición del halo de inhibición que el control negativo (22,93 vs. 6,0), y menor promedio en la medición del halo de inhibición que CHX (22,93 vs. 26,69).

DISCUSIÓN

Sobre la base de los parámetros establecidos en la investigación de *Maji* y otros,⁽⁸⁾ se interpreta que un halo inhibición mayor o igual que 12 mm hace que el SM sea sensible y que valores inferiores hacen que este sea resistente frente a estos microorganismos al aplicar los dentífricos testados. La presente investigación encontró que los dentífricos CX1 y GC fueron resistentes, y el dentífrico GX2 así como la clorhexidina al 0,12 % fueron sensibles frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

El xilitol ha sido motivo de investigación para muchos autores con el fin de conocer la efectividad de los dentífricos que contienen xilitol y flúor orientados a niños y adultos, como lo muestra la revisión sistemática de Cochrane de *Riley* y otros,⁽⁷⁾ no se pudo asegurar la eficacia de los dentífricos fluorados con xilitol en comparación con los dentífricos fluorados; por ende no se ha evaluado la acción antibacteriana de dentífricos que solo contienen xilitol, como componente activo, orientado a menores de 3 años.

Sabemos según investigaciones previas^(14,15) que el xilitol tiene la capacidad de promover remineralización, estabilizar el pH, reducir el número de *Streptococcus mutans* además presenta acción preventiva en la presentación de goma de mascar a una dosis necesaria de 3-8 g/día con una frecuencia de 3-5 veces/día y durante 5 min. Sin embargo, *Mitrakul* y otros,⁽¹⁶⁾ no encontraron cambios en el número de SM cuando se evaluaron a pacientes a los que se les administró gomas de mascar a una dosis de 7,3 g/día durante 4 semanas.

En la presente investigación se observó que el dentífrico GX2 presenta actividad antibacteriana a diferencia de GX1, a pesar de que ambos contienen xilitol como componente activo. Es posible que esta controversia esté relacionada con la concentración del componente activo y es importante señalar que la actividad antibacteriana de un dentífrico es el resultado de la interacción de sus componentes.

En relación con el dentífrico GC, los resultados de este estudio mostraron que no presenta actividad antibacteriana frente a la cepa de *Streptococcus mutans*, y al evaluar su composición se puede apreciar que el componente activo, es el extracto de *Calendula officinalis*; estos hallazgos coinciden con *Carvalho*⁽¹⁷⁾ discrepan con los hallazgos de *Anushree* y otros⁽¹⁸⁾ que evaluaron tres dentífricos con Caléndula de diferente composición en comparación a la presente investigación, encontraron halos de inhibición de 18-28 mm, pero los autores atribuyen esta acción a la presencia de otros componentes en el dentífrico. Sin embargo, las investigaciones que evaluaron el extracto de caléndula en solución pura, *Ferreira* y otros,⁽¹⁹⁾ *Krumina* y otros⁽²⁰⁾ y *Maji* y otros,⁽⁸⁾ informaron halos de inhibición de 10-15 mm, con tamaños de pocillos de 5-6mm.

La diferencia de nuestros resultados con los estudios antes mencionados es debido a la concentración (el cual está ligado al grupo etario al cual va dirigido), componentes, medio de cultivo, cepa bacteriana, etc. A pesar de estas discrepancias en los resultados, los autores mencionados y la presente investigación concuerdan que el extracto de Caléndula tiene baja actividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* al ser comparados con otros dentífricos.

En relación con la CHX al 0,12 %, autores como *Ferreira* y otros⁽¹⁹⁾ así como *Maji* y otros⁽⁸⁾ encontraron halos de 14-24 mm, valores que se asemejan a nuestros resultados (media: 26,69; DE:1,85) presentando mayor actividad antibacteriana, indistintamente al tipo de estudio. A su vez concordamos con los autores, en que el halo de inhibición de la CHX 0,12 % es mayor en todos los casos al compararlo con los halos de diferentes dentífricos sin flúor. Al evaluar los datos estadísticamente, se acepta parcialmente la hipótesis planteada y podemos decir que hay evidencias de inactividad bacteriana en GX1, GC y H₂O a excepción de GX2, que presentó actividad antibacteriana con un halo inferior al hallado con el componente de gluconato de clorhexidina al 0,12 %, corroborada con la prueba de Mann-Whitney $p=0,00$ ($p<0,05$).

Es importante resaltar que para evitar posibles sesgos ocasionados producto de la manipulación de los dentífricos y soluciones controles, se realizó el estudio experimental a doble ciego, lo que garantizó de esta manera la objetividad de los resultados de la investigación.

La limitación de la presente investigación fue el desconocimiento de la diferencia entre rotulado encontrado con respecto a la concentración de los componentes activos de los dentífricos testados.

Podemos concluir que solo uno de los dentífricos con xilitol para bebés presentó actividad antibacteriana frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esta diferencia entre los dentífricos probablemente esté asociada a la interacción de los otros ingredientes del dentífrico y de la concentración del componente activo, entre otros. Se recomienda realizar otros estudios complementarios para conocer el efecto preventivo del xilitol contra la caries dental a largo plazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF. Microbiología e Inmunología Oral. México: El Manual Moderno; 2015.
2. Hernández HA, Coronel RC, Monge ZM, Quintana HC. Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatr Integral*. 2015;14(5):337-54.
3. Cephas KD, Kim J, Mathai RA, Barry KA, Dowd SE, Meline BS, et al. Comparative analysis of salivary bacterial microbiome diversity in edentulous infants and their mothers or primary care givers using pyrosequencing. *PLoS One*. 2011;6(8):e23503.
4. Elías PMC, Arellano SC, Tello MPG. Odontología para Bebés. Fundamentos Teóricos y Prácticos para el Clínico. 2a ed. Perú: Ed. Savia; 2016.
5. Serrano-Coll HA, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev CES Odont*. 2015;28(2):112-8.
6. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on the use of xilitol. *Oral Health Policies*. 2015;39(6):54-6.
7. Riley P, Moore D, Ahmed F, Sharif MO, Worthington HV. Xylitol-containing products for preventing dental caries in children and adults (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Mar;26(3):CD010743.
8. Maji SS, Gururaj BS, Jyotirmayee R, Chethana KC, Bhushan K, Kumar S. Efficacy of *Calendula officinalis* extract (marigold flower) as an antimicrobial agent against oral microbes: an *in vitro* study in comparison with chlorhexidine digluconate. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017;11(10):ZC05-ZC10.
9. Abudunia AM, Marmouzi I, Faouzi ME, Ramli Y, Taoufik J, El Madani N, et al. Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *J Mycol Med*. 2017;27(1):90-7.
10. Wyganowska-Swiatkowska M, Urbaniak P, Szkaradkiewicz A, Jankun J, Kotwicka M. Effects of chlorhexidine, essential oils and herbal medicines (*Salvia*, *Chamomile*, *Calendula*)

- on human fibroblast *in vitro*. Central European Journal of Immunology. 2016;41(2):125-31.
11. Mahyari S, Mahyari B, Emami SA, Malaekheh-Nikouei B, Jahanbakhsh SP, Sahebkar A, et al. Evaluation of the efficacy of a polyherbal mouthwash containing *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* and *Calendula officinalis* extracts in patients with gingivitis: A randomized double-blind placebo-controlled trial. Complement Ther Clin Pract. 2016;22:93-8.
 12. Elquizábal AM, Moromi NH. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Odontología Sanmarquina. 2007;10(2):18-20.
 13. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Document M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 25th Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
 14. Cronin RJ. Xylitol: A Sweet for Healthy Teeth and More. Alternative and Complementary Therapies. 2003;9:139-41. 10.1089/107628003322017387
 15. Burt BA. The use of sorbitol and xylitol sweetened chewing gum in caries control. J Am Dent Assoc. 2006;137(2):190-6.
 16. Mitrakul K, Srisatjaluk R, Vongsawan K, Teerawongpaibroj C, Choongphong N, Panich T, et al. Effects of short-term use of xylitol chewing gum and maltitol oral spray on salivary *Streptococcus mutans* and oral plaque. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine And Public Health. 2017 Mar;48(2):485-93.
 17. Carvalho FG, Negrini T de C, Sacramento LV, Hebling J, Spolidorio DM, Duque C. The *in vitro* antimicrobial activity of natural infant fluoride-free toothpastes on oral microorganisms. J Dent Child (Chic). 2011;78(1):3-8.
 18. Anushree B, Fawaz MA, Narahari R, Shahela, Syed A. Comparison of Antimicrobial Efficacy of triclosan-Containing, Herbal and Homeopathy toothpastes - An *In vitro* Study. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015;9(10):DC05-DC08.
 19. Ferreira Filho JCC, Cavalcanti Gondim BL, Alves DCD, Cadete DFC, Gondim VAM. Physical Properties and Antibacterial Activity of Herbal Tinctures of *Calendula officinalis* L.) and Cashew Tree (*Anacardium occidentale* L.). Pesq Bras Odontoped Clin Integ. 2014;14(1):49-53.
 20. Krumina G, Ratkevicha L, Nikolajeva V, Babarikina A, Babarykin D. Influence of plant extracts on the growth of oral pathogens *Streptococcus mutans* and *Candida albicans in vitro*. P Est Acad Sci. 2015;64(1):62-7.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Contribuciones de los autores

Sally Thressy, Sanchez Ballena: Planteamiento del problema, desarrollo del marco teórico, búsqueda en el laboratorio, redacción de la discusión y conclusiones.

Mario César Elías Podestá: Selección de la muestra y cegamiento.

César Arellano Sacramento: Diseño metodológico y asesoramiento estadístico.

Montserrat Diéguez Pérez: revisión bibliográfica, elaboración y redacción del artículo.

Financiación

Esta investigación fue autofinanciada.