



Potencial antibacteriano de un enjuague bucal a base de *Azadirachta indica* (neem) sobre patógenos orales

Antibacterial potential of a mouthwash based on *Azadirachta indica* (neem) on oral pathogens

Miguel Angel Ruiz-Barrueto^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-3373-4671>

Wilfredo Terrones-Campos² <https://orcid.org/0000-0002-4818-5855>

Daniela Alejandra Cueva-Yesán³ <https://orcid.org/0000-0002-2692-3976>

María Félix Sánchez-Villavicencio⁴ <https://orcid.org/0000-0003-2036-0110>

José Elías Cabrejo-Paredes⁵ <https://orcid.org/0000-0002-7335-0541>

¹Universidad César Vallejo. Escuela Profesional de Estomatología. Piura, Perú.

²Universidad Nacional de Piura. Escuela Profesional de Estomatología. Piura, Perú.

³Centro de Salud La Cruz. Departamento de Odontología. Tumbes, Perú.

⁴Universidad Nacional Agraria de La Selva. Facultad de Informática y Sistemas. Tingo María, Perú.

⁵Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Medicina. Trujillo, Perú.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: mruizb@ucv.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La alta prevalencia de enfermedades orales y los efectos colaterales de los fármacos sintéticos ha impulsado el estudio de alternativas terapéuticas como las plantas medicinales que sean seguras, efectivas y económicas para la población.

Objetivo: Evaluar el potencial antibacteriano de 2 enjuagues bucal a base de *Azadirachta indica* (neem) sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*.



Métodos: Estudio experimental. Se elaboraron 2 enjuagues bucales del extracto hidroetanólico de neem con concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL. El potencial antibacteriano se evaluó por el método de difusión en disco. Los datos fueron analizados con ANOVA y Tukey en el paquete estadístico SPSS v.26.

Resultados: Para *Streptococcus mutans* el halo del enjuague bucal con 25 mg/mL de extracto de neem fue de $25,12 \pm 0,798$ mm; el de 50 mg/mL formó un halo de $29,40 \pm 1,197$ mm; el control negativo un halo de $8,62 \pm 0,132$ mm y la clorhexidina 0,12 % un halo de $17,64 \pm 0,160$ mm. Para *Enterococcus faecalis*, el halo del enjuague bucal con 25 mg/mL fue de $18,23 \pm 1,150$ mm; el de 50 mg/mL un halo de $20,93 \pm 0,487$ mm; el control negativo un halo de $7,91 \pm 0,417$ mm y la clorhexidina 0,12 % un halo de $16,50 \pm 0,505$ mm.

Conclusión: Los enjuagues bucales a base de neem presentan potencial antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* y podrían ser utilizados en un futuro en su control y el de otros patógenos orales.

Palabras clave: antibacterianos; extractos vegetales; *Azadirachta*; *Streptococcus mutans*; *Enterococcus faecalis*; antisépticos bucales.

ABSTRACT

Introduction: The high prevalence of oral diseases and the side effects of synthetic drugs has promoted the study of therapeutic alternatives such as medicinal plants that are safe, effective and economical for the population.

Objective: To evaluate the antibacterial potential of 2 mouthwashes based on *Azadirachta indica* (neem) on *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*.

Methods: Experimental study. Two mouthwashes were made from the hydroethanolic extract of neem with concentrations of 25 mg/mL and 50 mg/mL. The antibacterial potential was evaluated by the disk diffusion method. The data were analyzed with ANOVA and Tukey in the statistical package SPSS v.26.

Results: For *Streptococcus mutans*, the halo of the mouthwash with 25 mg/mL of neem extract was 25.12 ± 0.798 mm; that of 50 mg/mL formed a halo of 29.40 ± 1.197 mm; the negative control a halo of 8.62 ± 0.132 mm and chlorhexidine 0.12% a halo of 17.64 ± 0.160 mm. For *Enterococcus faecalis*, the



halo of the mouthwash with 25 mg/mL was $18.23 \pm 1,150$ mm; that of 50 mg/mL a halo of 20.93 ± 0.487 mm; the negative control a halo of 7.91 ± 0.417 mm and chlorhexidine 0.12% a halo of 16.50 ± 0.505 mm.

Conclusion: Neem-based mouthwashes have in vitro antibacterial potential against *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* and could be used in the future to control them and other oral pathogens.

Keywords: antibacterials; vegetable extracts; *Azadirachta*; *Streptococcus mutans*; *Enterococcus faecalis*; oral antiseptics.

Recibido: 15/09/2022

Aprobado: 11/04/2023

INTRODUCCIÓN

La caries dental debido a su alta prevalencia sigue siendo en la actualidad un problema de salud pública mundial.⁽¹⁾ *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es considerado un microorganismo cariogénico y la principal bacteria asociada al inicio y progreso de esta enfermedad.⁽²⁾ Los ácidos producto del metabolismo de los carbohidratos remanentes de la dieta desgastan el esmalte y desencadenan la pérdida de estructura dentaria.⁽³⁾ Los dientes son una parte importante del cuerpo humano; su ausencia afecta la salud oral, la salud general y mental del individuo, así como su capacidad para socializar.⁽⁴⁾

De igual forma, la principal causa de las infecciones endodónticas, es la presencia de microorganismos. El patógeno oportunista más frecuentemente aislado en estas infecciones es *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).⁽⁵⁾ Esta bacteria anaerobia facultativa puede sobrevivir sin nutrientes y en presencia de fármacos e irrigantes intracanales debido a la facilidad para adquirir resistencia a los antibióticos, crecer a pH alcalino, tolerar rangos amplios de temperatura. Tiene la capacidad para invadir los túbulos dentinarios, utilizar fluidos del ligamento periodontal y suero como nutrientes y adherirse al colágeno, además de



otros factores de virulencia que le permiten sobrevivir en condiciones desfavorables y lo hacen difícil de eliminar.^(6,7)

Las prácticas preventivas y el tratamiento de las principales enfermedades orales, incluyen la higiene bucal mecánica y la utilización de productos complementarios de higiene oral, como los enjuagues bucales que pueden contener compuestos antimicrobianos que eliminan a los microorganismos de las placas dentales.⁽⁸⁾ La actividad antibacteriana de los enjuagues bucales es una ventaja, pues su naturaleza permite que llegue a zonas donde otros elementos no podrían. Independientemente de la marca del producto, el principal componente antimicrobiano colocado en la formulación siempre es una sustancia química.⁽⁹⁾

Debido al incremento acelerado de la resistencia a los antimicrobianos y la perspectiva limitada del descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos sintéticos, el uso efectivo de antimicrobianos en el futuro es incierto.⁽¹⁰⁾ Por ello, es primordial investigar nuevas fuentes alternativas de compuestos bioactivos, eficaces y seguros para la población.⁽¹¹⁾ Teniendo en cuenta que las plantas medicinales se han utilizado para curar diversas enfermedades durante siglos, una de estas nuevas opciones son los medicamentos a base de plantas medicinales, que podrían ser una buena opción debido a la seguridad, la biodegradabilidad y la imposición de menos efectos secundarios.⁽¹²⁾

La medicina complementaria y alternativa recomienda numerosos enjuagues bucales a base de plantas medicinales, para el control de diversas enfermedades orales.⁽¹³⁾ A pesar que ya se ha probado la eficacia antibacteriana de diversas plantas medicinales autóctonas y adaptadas al territorio peruano, los enjuagues bucales a base de productos vegetales están limitados a unos pocos extractos y aceites esenciales.⁽⁸⁾ En ese contexto, *Azadirachta indica* (neem) es una especie vegetal bien conocida en el mundo, por su gran potencial etnofarmacológico. El neem como comúnmente se le denomina, se desarrolla bien en diversas partes del país. Algunos estudios^(14,15) dan cuenta que el azadirachtin y los flavonoides polifenólicos purificados de hojas de neem, son los principales responsables de su potencial antibacteriano.

Al respecto, se ha reportado que el extracto de hojas de neem tiene actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Se logró identificar que el beta-d-mannofuranoside y el ogeranyl son los compuestos con mayor actividad antimicrobiana.⁽¹⁶⁾ También se ha establecido que la catequina es el compuesto bioactivo de *A. indica* (neem) más eficiente con actividad antibiopelícula y



antiquorum de *E. faecalis* y *Porphyromonas gingivalis*, evita que estas bacterias se protejan entre sí en presencia de oxígeno. Este compuesto natural podría ser utilizado como fármaco en el tratamiento de infecciones crónicas asociadas a la biopelícula dental.^(17,18)

El objetivo de la presente investigación es evaluar el potencial antibacteriano *in vitro* de 2 enjuagues bucales del extracto hidroetanólico de hojas de *A. indica* (neem), con concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL sobre cepas de referencia de *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ y *Enterococcus faecalis* ATCC®29212™.

MÉTODOS

La investigación fue de tipo básica, de enfoque cuantitativo con diseño experimental *in vitro*. La muestra fue calculada en el programa G*Power v. 3.1.9.7⁽¹⁹⁾ y estuvo constituida por placas Petri sembradas con cepas estandarizadas de *S. mutans* ATCC®35668™ y *E. faecalis* ATCC®29212™. Se realizaron 19 repeticiones por cada enjuague bucal, según la concentración de extracto y tipo de bacteria, lo que hizo un total de 152 unidades experimentales. La ejecución se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigación en Ciencia y Tecnología de la Universidad César Vallejo en la ciudad de Trujillo, Perú.

Obtención del extracto hidroetanólico

El material vegetal, principalmente hojas frescas, se recolectaron en la provincia de Piura, Perú, durante el mes de enero del 2022, en una cantidad aproximada de 1 kg. Las muestras vegetales se identificaron taxonómicamente como *Azadirachta indica* Jussieu 1830 MELIACEAE “neem” en el *Herbarium Piurense* con registro No. 0004-2022. Las hojas fueron seleccionadas, lavadas con agua corriente, desinfectadas con alcohol al 70 % y posteriormente secadas en estufa a 40 °C durante 30 horas. El material vegetal seco y molido fue empaquetado en papel de filtro Whatman® grado 1 y colocado en un sistema Soxhlet, para la obtención del extracto hidroetanólico. Una vez obtenido el extracto total fue concentrado y secado en rotavapor Isolab® y almacenado en refrigeración en un frasco de vidrio ámbar hasta su utilización. Las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL se prepararon al momento de la experimentación utilizando como diluyente dimetilsulfóxido (DMSO) al 1 %.



Preparación de enjuagues bucales herbales a base de neem

Se prepararon 2 enjuagues bucales a los cuales se les incorporó las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL del extracto hidroetanólico de neem. Dichas concentraciones son estándares para la evaluación toxicológica de productos naturales. La fórmula unitaria para 80 mL fue la siguiente; emal (Polioxietileno lauril éter sulfato de sodio) 70; al 3,75 %, 3 g, glicerina al 18,38 %, 14,7 g, sorbitol al 5,63 %, 4,5 g, sacarina al 0,04 %, 0,032 g y 10 mL de extracto de neem a concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL, agua al 33,88 % c.s.p., 80 mL.

Reactivación de cepas y estandarización del inóculo bacteriano

Las cepas certificadas y liofilizadas fueron adquiridas de la empresa GenLab Perú S.A.C. La reactivación se realizó según recomendaciones del fabricante en caldo Müller-Hinton (Millipor®, Alemania) para *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ y en caldo Infusión Cerebro Corazón (Millipor®, Alemania) para *Enterococcus faecalis* ATCC®29212™; 24 horas antes de la evaluación en condiciones de aerobiosis a 36,5 °C en incubadora microbiológica Memmert®. La estandarización del inóculo de ambas bacterias se realizó por turbidimetría en espectrofotómetro Thermo Scientific® Genesys 150 y ajustado a la escala McFarland de 0,5 equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Evaluación del potencial antibacteriano por el método de difusión en disco

El efecto antibacteriano de los extractos fue determinado por el método estandarizado de difusión en disco según el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).⁽²⁰⁾ A partir del inóculo estandarizado se incorporaron 200 µL de la suspensión bacteriana a superficies de placas Petri con Mitis Salivarius Agar (Millipor®, Alemania). Se colocaron 4 discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro cargados con cada volumen de enjuague bucal según concentración y sustancia a evaluar. Los discos fueron colocados sobre las placas inoculadas con cada una de las bacterias y fueron incubadas durante 24-48 horas a 36,5 °C en microaerofilia. Después del periodo de incubación se realizó la medición de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano expresados en milímetros con un calibrador mecánico Starrett®.



Análisis estadístico

Los datos correspondientes a los diámetros de halos de inhibición fueron analizados en el paquete estadístico SPSS v.26.0. Se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y análisis de varianza (ANOVA). La significación estadística se estableció mediante el análisis *post hoc* de Tukey ($p=0,05$).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados promedios del diámetro de las zonas de inhibición generados por los enjuagues bucales a base de 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de neem sobre *S. mutans* ATCC®35668™. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos evaluados ($p < 0,05$). La efectividad de los enjuagues bucales con 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de neem fue superior al del control positivo clorhexidina 0,12 %.



Tabla 1 - Potencial antibacteriano de un enjuague bucal con concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de *A. indica* (neem) sobre *S. mutans* ATCC®35668™

Bacteria	Sustancia	Zona de inhibición en mm				
		Media ± D.E*	Mínimo	Máximo	Comparación	p**
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC®35668™	EB + 25 mg/mL	25,12 ± 0,798	23,70	26,00	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	EB + 50 mg/mL	29,40 ± 1,197	27,70	31,50	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	EB Base	8,62 ± 0,132	8,50	9,40	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	CHX 0,12%	17,64 ± 0,160	17,20	17,90	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000

*Desviación estándar

** Sig. HDS Tukey

EB: Enjuague bucal; CHX: Clorhexidina.

En la tabla 2 se observan los promedios de diámetros de las zonas de inhibición de los enjuagues bucales a base de 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de neem sobre *E. faecalis* ATCC®29212™. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de tratamientos evaluados (p< 0,05), excepto entre la clorhexidina 0,12 % y el enjuague bucal con 25 mg/mL de neem. Ver figura 1.



Tabla 2 - Potencial antibacteriano de un enjuague bucal con concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de *A. indica* (neem) sobre *E. faecalis* ATCC®29212™

Bacteria	Sustancia	Zona de inhibición en mm				
		Media ± D.E*	Mínimo	Máximo	comparación	p**
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC®29212™	EB + 25 mg/mL	18,23 ± 1,150	16,80	20,40	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	EB + 50 mg/mL	20,93 ± 0,487	20,10	21,60	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	EB Base	7,91 ± 0,417	7,10	8,60	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000
	CHX 0,12%	16,50 ± 0,505	16,50	18,20	EB + 50 mg/mL	0,000
					EB Base	0,000
					CHX 0,12%	0,000

*Desviación estándar

** Sig. HDS Tukey

EB: Enjuague bucal; CHX: Clorhexidina.

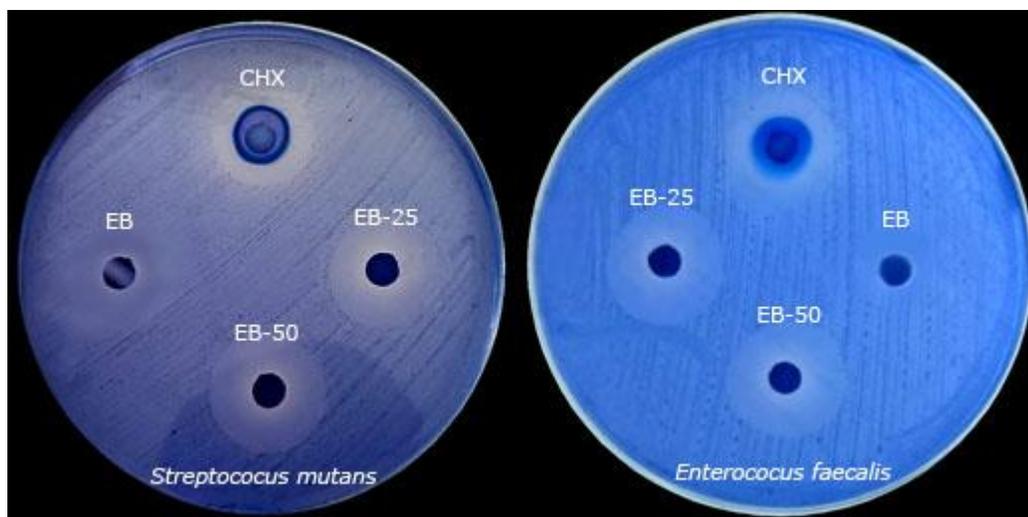


Fig. 1 - Zonas de inhibición de un enjuague bucal con concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL y de extracto hidroetanólico de *A. indica* (neem) sobre *S. mutans* ATCC®35668™ y *E. faecalis* ATCC®29212™.



DISCUSIÓN

La microbiota oral que incluye bacterias benéficas y patógenas juega un papel crucial en la homeostasis y en el mantenimiento de la salud oral y el bienestar general del ser humano. Sin embargo, una vez que se rompe este equilibrio, con predominio de patógenos, estos pueden conducir a una variedad de enfermedades orales, como la caries dental, en cuyo inicio y progreso *Streptococcus mutans* participa de manera activa.⁽¹⁾ Por otra parte, *Enterococcus faecalis* es uno de los principales responsables del fracaso del tratamiento endodóntico en los casos de periodontitis apical crónica no supurativa.⁽⁵⁾ Su permanencia en el conducto radicular se asocia a su resistencia natural a diversos irrigantes intracanal y a la capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles mediante la formación de biopelículas con otros microorganismos.⁽⁶⁾ Esta realidad obliga a desarrollar nuevas alternativas farmacológicas derivadas de plantas medicinales como *Azadirachta indica* A. Juss (neem), que es una hierba medicinal originaria de la India, pero que crece bien en la mayoría de los países tropicales y subtropicales, incluidos el Perú; de la cual se han aislado con éxito más de 140 compuestos bioactivos, ha sido utilizada en la medicina tradicional y complementaria durante miles de años, y no se han reportado efectos secundarios debido a su utilización. Estudios precedentes,^(14,15,16,17) destacan su potencial antimicrobiano, entre muchos otros efectos. Su principio activo más importante es la azadiractina, sin embargo, también contiene limonoides tipo tetranortriterpenoides, quercetina, sitosterol, flavonoides polifenólicos, principalmente en las hojas de la planta, a los que se les atribuye sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Al respecto, *Lu* y otros,⁽²¹⁾ evaluaron la actividad antibacteriana de 15 tipos de limonoides extraídos de semillas de neem. Informan que el compuesto 17 β -hidroxinimbocinol y el 2,3-dihidronimbolida muestran actividad inhibitoria contra *E. coli* y moderada contra *Staphylococcus epidermidis*; mientras que, el 6-homodesacetilnimbina y el nimbineno inhiben el crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se ha indicado que la técnica de extracción y el solvente utilizado para la recuperación de biocompuestos de plantas medicinales, son relevantes en la evaluación del efecto terapéutico de un producto vegetal, pues influirían en la cantidad de los compuestos bioactivos recuperados. Al respecto, *Kalita* y otros⁽²²⁾



determinaron el potencial antibacteriano del extracto de neem y otras plantas contra *E. faecalis*; lograron establecer que el extracto acetónico muestra mayor eficacia antibacteriana que el extracto acuoso. Por su parte, *Altayb* y otros,⁽¹⁶⁾ y *Arévalo-Híjar* y otros,⁽²³⁾ comunican que el extracto metanólico de neem tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *E. faecalis*. Además, se identificó a *Ogeraniol* un Beta d-manofuranósido como un agente antibacteriano prometedor, para el control de microorganismos de interés estomatológico y médico.⁽¹⁶⁾

Sin embargo, al parecer este no es el único compuesto con alto potencial antibacteriano presente en el extracto de neem, pues *Lahiri* y otros,⁽¹⁷⁾ compararon el potencial antiplaca de la quercetina, la nimbolida, la nimbina y la azardiractina; reportan que la catequina fue el compuesto bioactivo más eficiente de *A. indica* con actividades antibiopelícula y antiplaca de la biopelícula dental formada por *Porphyromonas gingivalis* y *Alcaligenes faecalis*. Esto se corrobora con lo señalado por *Heyman* y otros,⁽²⁴⁾ quienes reportan que la actividad antibacteriana del extracto de neem sobre *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* es dependiente de la concentración.

Estos resultados no solo corroboran la efectividad antibacteriana de los principios activos presentes en el extracto de neem sobre bacterias patógenas orales, sino también, sobre bacterias resistentes a los antibióticos, tal como lo señalaron *Ali* y otros⁽²⁵⁾ y *Zihadi* y otros,⁽²⁶⁾ al establecer que el extracto de hojas de neem a concentraciones de entre 12,5 mg/mL y 112,5 mg/mL muestran efecto inhibitorio y bactericida sobre diferentes especies de *Salmonella*, *Pasteurella multocida*, *S. aureus* y *E. coli* resistentes a múltiples fármacos.

Se ha demostrado que la capacidad antibacteriana del extracto de neem reportada en diversas investigaciones se mantiene cuando dichos productos herbales son incorporados en formulaciones como enjuagues bucales, colutorios e irrigantes. Esto se fundamenta también en los estudios de *Singh* y otros,⁽²⁷⁾ quienes revelan que las tabletas de enjuague bucal efervescente a base neem muestran buen potencial antibacteriano sobre *S. mutans* y en el mantenimiento de la higiene bucal, en comparación a los enjuagues bucales que contienen alcohol. Por su parte, *Joy* y otros,⁽²⁸⁾ reportan que el efecto antibacteriano del neem como irrigante endodóntico sobre *E. faecalis* fue similar al de la clorhexidina y superior al de otros productos comerciales.



De manera similar, *Kumari* y otros,⁽²⁹⁾ establecen que la incorporación de extractos de neem en nuevos materiales de tratamiento restaurador atraumático, muestran actividad antibacteriana considerable contra *S. mutans*. Esto se correlaciona con lo reportado por *Dhingra* y otros,⁽³⁰⁾ quienes informan que la efectividad de un enjuague bucal herbal preparado con neem, para controlar la placa dental y la salud gingival, fue similar al que se obtiene con la clorhexidina cuando se emplea después del cepillado en pacientes con enfermedad periodontal inicial.

Se concluye que los enjuagues bucales preparados con las concentraciones de 25 mg/mL y 50 mg/mL de extracto hidroetanólico de hojas de *Azadirachta indica* (neem) presentan potencial antibacteriano *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC®35668™ y *Enterococcus faecalis* ATCC®29212™, superior al de la clorhexidina 0,12 %.

Se recomienda a la comunidad científica continuar investigando el potencial antimicrobiano de *Azadirachta indica* (neem) a fin de que a mediano plazo sus compuestos bioactivos puedan ser utilizados para el control de microorganismos de interés estomatológico y como producto complementario en la higiene oral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peres MA, Macpherson LM, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019; 394(10194):249-60. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8
2. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Microbiological Approach. *J Clin Infect Dis Pract*. 2017; 2(1):1000118. DOI: 10.4172/2476-213X.1000118
3. Rathee M, Sapra A. Dental Caries. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. [acceso: 02/06/2022]:[aprox. 8 pant.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699/>
4. Crall JJ, Forrest CB. A Life Course Health Development Perspective on Oral Health. In: Halfon N, Forrest C, Lerner R, Faustman E (eds). *Handbook of Life Course Health Development*. Springer, Cham. 2018. p. 299–320. DOI: 10.1007/978-3-319-47143-3_13



5. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. 2020; 12(3):e7257. DOI: 10.7759/cureus.7257
6. Siqueira JF, Rôças IN. Current status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int. Endod J*. 2022; 55(3):512–30. DOI: 10.1111/iej.13677
7. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019; 24(3):e364-e372. DOI: 10.4317/medoral.22907
8. Rajendiran M, Trivedi HM, Chen D, Gajendrareddy P, Chen L. Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases. *Molecules*. 2021; 26(7):2001. DOI: 10.3390/molecules26072001
9. Radzki D, Wilhelm-Węglarz M, Pruska K, Kusiak A, Ordyniec-Kwaśnica I. A Fresh Look at Mouthwashes-What Is Inside and What Is It For? *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(7):3926. DOI: 10.3390/ijerph19073926
10. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BR, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health*. 2021; 14(12):1750-66. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.10.020
11. Miethke M, Pieroni M, Weber T, Brönstrup M, Hammann P, Halby L, et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat Rev Chem*. 2021; 5:726–49. DOI: 10.1038/s41570-021-00313-1
12. Kebede T, Gadisa E, Tufa A. Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. *PLoS ONE*. 2021; 16(3):e0249253. DOI:10.1371/journal.pone.0249253
13. Sedigh-Rahimabadi M, Fani M, Rostami-Chijan M, Zarshenas MM, Shams M. A Traditional Mouthwash (*Punica granatum* var *pleniflora*) for Controlling Gingivitis of Diabetic Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2017; 22(1):59-67. DOI: 10.1177/2156587216633370



14. Islas JF, Acosta E, G-Buentello Z, Delgado-Gallegos JL, Moreno-Treviño MG, Escalante B, et al. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. *J Funct Foods*. 2020; 74:104171. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104171
15. Wylie MR, Merrell DS. The Antimicrobial Potential of the Neem Tree *Azadirachta indica*. *Front Pharmacol*. 2022; 13:891535. DOI: 10.3389/fphar.2022.891535
16. Altayb HN, Yassin NF, Hosawi S, Kazmi I. In-vitro and in-silico antibacterial activity of *Azadirachta indica* (Neem), methanolic extract, and identification of Beta.d-Mannofuranoside as a promising antibacterial agent. *BMC Plant Biol*. 2022; 22(1):262. DOI: 10.1186/s12870-022-03650-5
17. Lahiri D, Nag M, Dutta B, Mukherjee I, Ghosh S, Dey A, et al. Catechin as the Most Efficient Bioactive Compound from *Azadirachta indica* with Antibiofilm and Anti-quorum Sensing Activities Against Dental Biofilm: an In Vitro and In Silico Study. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021; 193(6):1617-30. DOI: 10.1007/s12010-021-03511-1
18. Bansal V, Gupta M, Bhaduri T, Shaikh SA, Sayed FR, Bansal V, et al. Assessment of Antimicrobial Effectiveness of Neem and Clove Extract Against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: An In vitro Study. *Niger Med J*. 2019; 60(6):285-9. DOI: 10.4103/nmj.NMJ_20_19
19. Kang H. Sample size determination and power analysis using the G*Power software. *J Educ Eval Health Prof*. 2021; 18:17. DOI: 10.3352/jeehp.2021.18.17
20. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019 [acceso: 02/06/2022]. Disponible en: https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf
21. Lu XF, Lin PC, Zi JC, Fan XN. Limonoids from seeds of *Azadirachta indica* and their antibacterial activity. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2019; 44(22):4864-73. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20190813.202
22. Kalita C, Raja D, Saikia A, Saikia AK. Antibacterial property of *Azadirachta indica*, *Ocimum sanctum*, and *Vitex negundo* against oral microbes. *J Conserv Dent*. 2019; 22(6):602-6. DOI: 10.4103/JCD.JCD_268_19
23. Arévalo-Híjar L, Aguilar-Luis MÁ, Caballero-García S, Gonzáles-Soto N, Del Valle-Mendoza J. Antibacterial and Cytotoxic Effects of *Moringa oleifera* (*Moringa*) and *Azadirachta indica* (*Neem*)



Methanolic Extracts against Strains of *Enterococcus faecalis*. *Int J Dent*. 2018; 2018:1071676. DOI: 10.1155/2018/1071676

24. Heyman L, Hourri-Haddad Y, Heyman S, Ginsburg I, Gleitman Y, Feuerstein O. Combined antioxidant effects of Neem extract, bacteria, red blood cells and Lysozyme: possible relation to periodontal disease. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 17:399. DOI: 10.1186/s12906-017-1900-3

25. Ali E, Islam MS, Hossen MI, Khatun MM, Islam MA. Extract of neem (*Azadirachta indica*) leaf exhibits bactericidal effect against multidrug resistant pathogenic bacteria of poultry. *Vet Med Sci*. 2021; 7(5):1921-7. DOI: 10.1002/vms3.511

26. Zihadi MA, Rahman M, Talukder S, Hasan MM, Nahar S, Sikder MH. Antibacterial efficacy of ethanolic extract of *Camellia sinensis* and *Azadirachta indica* leaves on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *J Adv Vet Anim Res*. 2019; 6(2):247-52. DOI: 10.5455/javar.2019.f340

27. Singh M, Sharma D, Kumar D, Singh G, Swami G, Rathore MS. Formulation, Development, and Evaluation of Herbal Effervescent Mouthwash Tablet Containing *Azadirachta Indica* (Neem) and Curcumin for the Maintenance of Oral Hygiene. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2020; 14(2):145-61. DOI: 10.2174/1872211314666200820142509

28. Joy S, Nandha K, Jaiswal N, Vasudeva A, Prabha Tyagi S, Pratap U. Antibacterial Effect of *Azadirachta indica* (Neem) or *Curcuma longa* (Turmeric) against *Enterococcus faecalis* Compared with That of 5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine in vitro. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2017; 58(2):103-9. DOI: 10.2209/tdcpublication.2015-0029

29. Kumari P, Shenoy SM, Khijmatgar S, Chowdhury A, Lynch E, Chowdhury CR. Antibacterial activity of new atraumatic restorative treatment materials incorporated with *Azadirachta indica* (Neem) against *Streptococcus mutans*. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019; 9(4):321-5. DOI: 10.1016/j.jobcr.2019.06.014

30. Dhingra K, Vandana KL. Effectiveness of *Azadirachta indica* (neem) mouthrinse in plaque and gingivitis control: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2017; 15(1):4-15. DOI: 10.1111/idh.12191



Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos.*

Curación de datos: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos.*

Análisis formal: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, María Félix Sánchez-Villavicencio.*

Adquisición de fondos: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Wilfredo Terrones-Campos, José Elías Cabrejo-Paredes.*

Investigación: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos.*

Metodología: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, María Félix Sánchez-Villavicencio.*

Administración del proyecto: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Wilfredo Terrones-Campos, José Elías Cabrejo-Paredes.*

Recursos: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos, José Elías Cabrejo-Paredes.*

Software: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, María Félix Sánchez-Villavicencio.*

Supervisión: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, José Elías Cabrejo-Paredes.*

Validación: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, María Félix Sánchez-Villavicencio.*

Visualización: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos.*

Redacción – borrador original: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, Wilfredo Terrones-Campos, José Elías Cabrejo-Paredes.*



Redacción – revisión y edición: *Miguel Angel Ruiz-Barrueto, Wilfredo Terrones-Campos, Daniela Alejandra Cueva-Yesán, María Félix Sánchez-Villavicencio, José Elías Cabrejo-Paredes.*