

# Un colutorio formulado con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc actúa de manera específica sobre potenciales patógenos sin alterar el microbioma oral en personas sanas

Torrent-Silla D<sup>1</sup>, Mira J<sup>2</sup>, Pascual J<sup>3</sup>, Vivancos F<sup>4</sup>

## RESUMEN

**Introducción:** El uso de agentes antimicrobianos en colutorios orales puede desencadenar cambios en los microbiomas orales. Como alternativa a estos, se están empleando otros compuestos con capacidades antimicrobianas como el o-cymen-5-ol. El objetivo del presente estudio fue determinar su efecto en el microbioma oral.

**Métodos:** Se administró un colutorio con o-cymen-5-ol y cloruro de zinc a un grupo de voluntarios (n=51) durante 14 días y un segundo grupo de voluntarios (n=49) recibió un colutorio placebo. Se analizó la evolución del microbioma oral (zona subgingival) de los voluntarios de ambos grupos mediante metataxonomía.

**Resultados:** El colutorio con o-cymen-5-ol y cloruro de zinc no afectó significativamente al microbioma oral de los voluntarios. Además, se redujo la presencia de diversos grupos taxonómicos bacterianos potencialmente patógenos en los voluntarios tratados con el colutorio, como son los géneros *Prevotella* y *Actinomyces*, entre otros. Asimismo, el colutorio promovió la abundancia del género *Rothia*, beneficioso para la salud oral.

**Conclusiones:** La combinación de o-cymen-5-ol y cloruro de zinc es eficaz a la hora de inhibir ciertos patógenos orales, sin alterar el resto del microbioma. Este es el primer estudio en que se ha evaluado la efectividad de un colutorio de estas características en personas sanas.

**Palabras clave:** colutorio, cymen-5-ol, cloruro de zinc, patógenos, microbioma

## INTRODUCCIÓN

El microbioma oral representa la segunda comunidad microbiana más importante en humanos después de la del tubo digestivo. En concreto, más de 6.000 millones de bacterias pertenecientes a unas 700 especies diferentes coexisten en la cavidad oral<sup>1</sup>. En personas sanas, los microorganismos de la cavidad oral se encuentran en un estado de equilibrio, llevando a cabo funciones indispensables para preservar la salud del hospedador<sup>2</sup>. La gran mayoría de las bacterias orales son comensales, y llevan a cabo un papel clave

## ABSTRACT

**Introduction:** The use of antimicrobial agents in oral mouthwashes can trigger changes in oral microbiomes. As an alternative to these, other compounds with antimicrobial capacities such as o-cymen-5-ol are being used. The aim of the present study was to determine its effect on the oral microbiome.

**Methods:** A mouthwash with o-cymen-5-ol and zinc chloride was administered to one group of volunteers (n=51) for 14 days and a second group of volunteers (n=49) received a placebo mouthwash. The evolution of the oral microbiome (subgingival zone) of the volunteers in both groups was analyzed by metataxonomy.

**Results:** The mouthwash with o-cymen-5-ol and zinc chloride did not significantly affect the oral microbiome of the volunteers. In addition, the presence of several potentially pathogenic bacterial taxonomic groups was reduced in the volunteers treated with the mouthwash, such as the genera *Prevotella* and *Actinomyces*, among others. In addition, the mouthwash promoted the abundance of the genus *Rothia*, which is beneficial for oral health.

**Conclusions:** The combination of o-cymen-5-ol and zinc chloride is effective in inhibiting certain oral pathogens without altering the rest of the microbiome. This is the first study to evaluate the effectiveness of such a mouthwash in healthy individuals.

*Ique volum inis ut eu?*

**KEY WORDS:** mouthwash, cymen-5-ol, zinc chloride, pathogens, microbiome.

previniendo la proliferación de microorganismos patógenos<sup>1</sup>. Una disminución de las bacterias nativas por factores extrínsecos e intrínsecos puede dar lugar a una disbiosis del microbioma oral. Este proceso puede desencadenar la aparición de enfermedades orales tales como caries, gingivitis o periodontitis<sup>3</sup>.

Los colutorios se usan para prevenir y tratar enfermedades orales, y entre otros compuestos, llevan agentes antimicrobianos dirigidos a reducir la carga de bacterias patógenas implicadas en la formación de la placa dental y en el sangrado por gingivitis<sup>4</sup>. Los agentes antimicrobianos utilizados con mayor >>>

<sup>1</sup>Subdirector del Departamento de Genómica. Darwin Bioprospecting Excellence, S.L. Paterna (Valencia). [dtorrent@darwinbioprospecting.com](mailto:dtorrent@darwinbioprospecting.com)

<sup>2</sup>Director Médico. Lacer, S.A. Barcelona. [javier.mira@lacer.es](mailto:javier.mira@lacer.es)

<sup>3</sup>Director Científico. Darwin Bioprospecting Excellence, S.L. Paterna (Valencia). [jpascual@darwinbioprospecting.com](mailto:jpascual@darwinbioprospecting.com)

<sup>4</sup>Asesor Médico. Lacer, S.A. Barcelona. [fernando.vivancos@lacer.es](mailto:fernando.vivancos@lacer.es)

**CORRESPONDENCIA:** Daniel Torrent Silla

Subdirector Departamento de Genómica.

Darwin Bioprospecting Excellence, S.L.

Catedrático Agustín Escardino, 9 - 46980 Paterna (Valencia), España

Tel: + 34 962 990 266

**CORREO ELECTRÓNICO:** [dtorrent@darwinbioprospecting.com](mailto:dtorrent@darwinbioprospecting.com)

»»» frecuencia son de origen sintético, destacando la clorhexidina, el cloruro de cetilpiridinio y el triclosán. Sin embargo, en los últimos años está ganando protagonismo el uso de colutorios formulados con agentes antimicrobianos obtenidos a partir de plantas medicinales, debido fundamentalmente a los posibles efectos secundarios que presentan estos compuestos de origen sintético<sup>5</sup>. El O-cymen-5-OL es un compuesto fenólico obtenido de a partir de aceites esenciales procedentes de plantas como el tomillo o el orégano, que destaca por sus propiedades antibacterianas frente a un amplio espectro de microorganismos. Diversos estudios han demostrado que su utilización en combinación con cloruro de zinc evitaba la proliferación de bacterias patógenas y, por ende, la aparición de las mencionadas patologías bucales, además de prevenir la halitosis, el sangrado gingival, la formación de placa y la erosión dental<sup>6,7,8</sup>. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el efecto directo que ejercen ambos productos sobre el microbioma oral en su conjunto, no solo frente a potenciales microorganismos patógenos, sino también frente a las bacterias comensales, piezas clave para mantener la homeostasis oral.

En el presente estudio se han analizado los efectos de un colutorio formulado con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc sobre el microbioma oral de la zona subgingival de personas sanas, con el fin de determinar si alteraba o no la estructura del microbioma nativo, inhibiendo de manera específica a microorganismos potencialmente patógenos.

## MÉTODOS

### Diseño experimental del estudio

El objetivo del estudio fue analizar el efecto de administrar durante 14 días un colutorio cuyos principios activos eran el O-cymen-5-OL y cloruro de zinc sobre el microbioma oral de un grupo de voluntarios sanos. El estudio tuvo lugar entre el 11 y el 26 de noviembre de 2021, y se siguieron las pautas generales definidas por Zurko Research SL para ensayos en humanos (*Structure and Content of Clinical Study Reports from ICH Harmonised Tripartite Guideline*, ICH Buenas Prácticas Clínicas; *Guideline for good clinical practice* E6 [R2] of June 14th 2017, EMA/CHMP/ICH/135/1995 of May 1st 1996, *European Parliament and Council Guideline* 2001/20/CE of May 1st 2001), así como los principios éticos establecidos en la última edición de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes fueron informados previamente sobre la finalidad del estudio y los procedimientos a seguir, firmando un consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

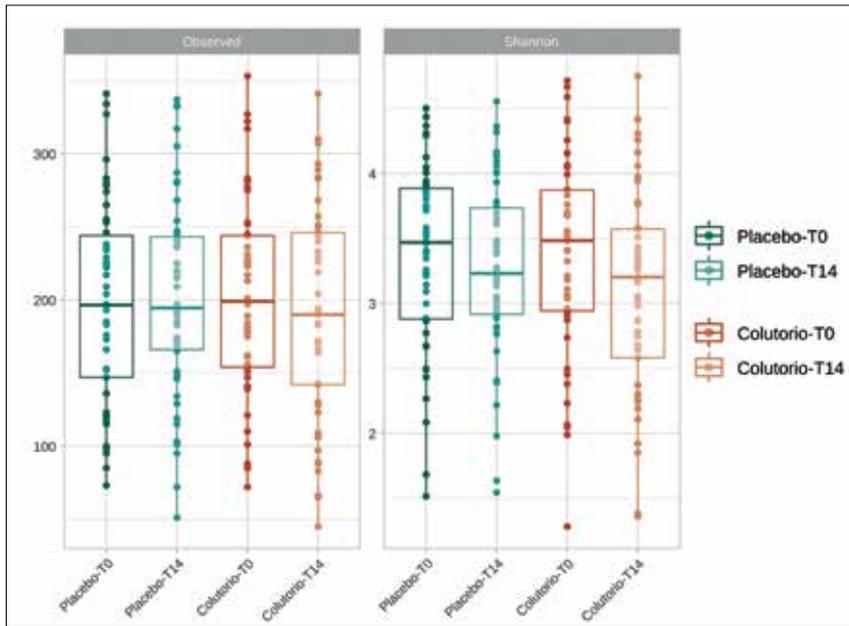
### Conjunto de voluntarios y toma de muestras biológicas

El estudio se realizó en 100 voluntarios sanos de entre 18 y 65 años de ambos sexos, que cumplían los requisitos de inclusión y exclusión definidos para el estudio, dirigidos a asegurar el buen estado de salud de los participantes. Se llevó a cabo un ensayo aleatorizado, doble ciego, donde se definieron dos grupos de estudio: uno denominado “colutorio”, compuesto por 51 voluntarios a los que se le administró el colutorio formulado con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc; y otro grupo denominado “placebo”, compuesto por 49 voluntarios, cuyo tratamiento consistió en agua destilada estéril. La pauta de administración consistió en dos enjuagues diarios de 1 minuto de duración (15 ml) con el colutorio o el placebo, según grupo asignado, durante 14 días consecutivos. Los enjuagues se realizaron tras el cepillado de dientes después de cada comida y cena, evitando la ingesta de comida durante los 15 minutos posteriores tras el enjuague. Los voluntarios no utilizaron a lo largo del estudio ningún otro colutorio complementario que pudiera enmascarar el efecto del colutorio objeto de estudio, y siguieron utilizando la pasta de dentífrica que utilizaban antes del estudio para descartar efectos colaterales por el cambio de la de pasta dentífrica. Para analizar el microbioma oral, se tomaron muestras de la región subgingival de los voluntarios antes de iniciar el tratamiento (tiempo 0) y cuando este finalizó a los 14 días (tiempo final). La toma de muestras se realizó utilizando un kit de muestreo basado en un hisopo estéril de punta fina, estéril y libre de material genético y de enzimas hidrolíticas. Tras la toma de muestra, los hisopos fueron introducidos en criotubos rellenos de una solución estabilizadora dirigida a preservar el ADN metagenómico, criopreservando los tubos a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

### Extracción de ADN y análisis bioinformático

La extracción del material genético se realizó con el kit *Dneasy PowerSoil* (QIAGEN). El uso de un kit comercial de extracción de ADN permitió reducir la variabilidad experimental y asegurar una concentración de ADN e integridad óptima. Una vez extraído el ADN, este se cuantificó mediante la tecnología *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Invitrogen, CA, USA).

Para estudiar analizar el perfil taxonómico de la comunidad microbiana presente en la zona subgingival de los voluntarios, se amplificó por PCR la región hipervariable V3-4 del gen ribosomal 16S presente en el ADN metagenómico. Las librerías NextSeq de Illumina se construyeron usando los siguientes cebadores: 5' - TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG - 3' (forward) y 5' - GTC »»»



**FIGURA 1.** Boxplots mostrando los índices de alfa diversidad en cada grupo experimental (placebo y colutorio) a lo largo del tratamiento (T0: tiempo inicial; T14: tiempo final). En concreto, se muestran los índices de riqueza (=observed) e índice de Shannon de bacterias clasificadas a un 99.9% de similitud del gen ribosomal 16S.

lisis se realizaron usando la versión de R 3.6.3 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

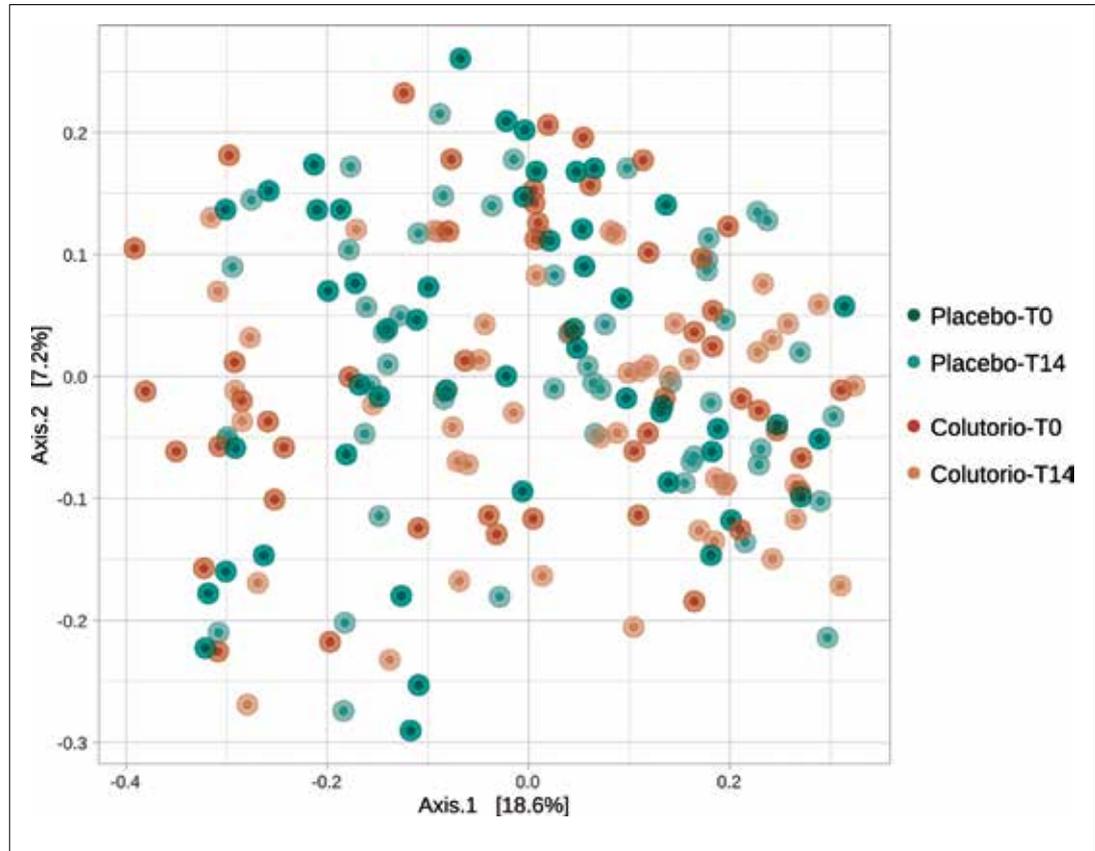
El uso de agentes antimicrobianos de origen vegetal como el O-cymen-5-OL para el cuidado bucal ha cobrado importancia en los últimos años, postulándose como una alternativa novedosa al uso de compuestos antisépticos más convencionales con son

la clorhexidina y el triclosán. Recientemente, se ha demostrado que el O-cymen-5-OL ayuda a reducir la inflamación gingival, el desarrollo de placa y el sangrado de las encías<sup>8,15</sup>. Dado su potencial antimicrobiano, evita la aparición de enfermedades periodontales provocadas por patógenos bacterianos orales<sup>16</sup>, así como el desarrollo de halitosis<sup>17</sup>. El O-cymen-5-OL posee un efecto anticaries más potente que otros compuestos convencionales como son la clorhexidina y el dióxido de cloro<sup>18</sup> y, a su vez, presenta una mayor capacidad de penetración en los biofilms microbianos en comparación con el triclosán o cloruro de cetilpiridinio, lo que se traduce en una mejor eficacia antibacteriana<sup>19</sup>. Así pues, en los últimos años, la formulación de colutorios con o-cymen-5-ol en combinación con cloruro de zinc está resultando ser una alternativa al empleo de compuestos antimicrobianos de origen sintético. Aunque se sabe de las propiedades antimicrobianas del O-cymen-5-OL en combinación con cloruro de zinc frente a patógenos concretos, hasta la fecha se desconoce su efecto sobre el conjunto del microbioma oral en personas sanas. Es de gran importancia comprobar que su uso no provoca cambios importantes en la comunidad bacteriana de la boca sana, ya que una alteración del microbioma por el uso de un agente antimicrobiano no selectivo podría desencadenar una disbiosis, incrementándose con ello la probabilidad del desarrollo de patologías orales.

Nuestros resultados demostraron que la utilización del O-cymen-5-OL en combinación con cloruro de zinc como agentes antisépticos no altera ni la riqueza ni la biodiversidad de especies del microbioma >>>

>>> TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C - 3' (reverse)<sup>9</sup>. La preparación de las librerías se realizó según el protocolo estándar de Illumina. Los amplicones fueron posteriormente secuenciados mediante la plataforma *Illumina MiSeq* (2x300 bp). La descripción completa del protocolo de amplificación y preparación de librerías se puede encontrar en Satari et al.<sup>10</sup>. Las secuencias brutas generadas por Illumina fueron importadas a la herramienta bioinformática *Qiime2*<sup>11</sup> para llevar a cabo un proceso inicial de control de calidad de las secuencias con DADA2. La asignación taxonómica de cada *amplicon sequence variant* (ASV), definidas a una similitud de secuencia del 99,9% de similitud, se realizó utilizando el módulo *classify-Sklearn* en combinación de la base de datos *SILVA v138*<sup>12</sup>. Las secuencias asignadas a cloroplastos, mitocondrias y especies eucariotas no fueron incluidas en el análisis. Los análisis de alfa diversidad (riqueza de taxones bacterianos y diversidad de Shannon) y beta diversidad de las comunidades bacterianas fueron realizados empleando el paquete *Phyloseq*<sup>13</sup> y *Vegan*<sup>14</sup> implementados en la plataforma R. Para comparar los valores de alfa diversidad y las abundancias relativas de los taxones entre tiempo inicial y final dentro de cada grupo se empleó la prueba de rangos de Wilcoxon para datos pareados con corrección de Bonferroni. Por otro lado, para determinar la existencia o no de diferencias significativas a nivel de beta diversidad se empleó la prueba *PERMANOVA* (análisis de permutaciones sobre las matrices de distancia). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un p-valor inferior a 0,05. Todos estos aná-

**FIGURA 2.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en distancias de Bray-Curtis del microbioma oral de los voluntarios, agrupados por grupo experimental (placebo y colutorio) y tiempo de muestreo (T0: tiempo inicial; T14: tiempo final).



	Placebo-T0	Placebo-T14	Colutorio-T0	Colutorio-T14
Firmicutes	57.65	63.05	60.17	65.27
Proteobacteria	17.86	13.96	16.44	13.01
Fusobacteriota	9.07	8.31	9.28	7.82
Bacteroidota	8.19	7.72	7.48	6.85
Actinobacteriota	4.44	4.48	4.5	4.76
Patescibacteria	1.3	1.45	1.27	1.15
Spirochaetota	0.79	0.44	0.32	0.54
Campilobacterota	0.53	0.51	0.49	0.49
Synergistota	0.12	0.03	0.03	0.08
Desulfobacterota	0.04	0.01	0	0.01
Unassigned Bacteria	0.01	0.01	0.01	0.02
Chloroflexi	0.01	0	0	0

**FIGURA 3.** Abundancias relativas (%) de los filos bacterianos identificados en los grupos de ensayo (placebo y colutorio) y en cada punto temporal (T0: tiempo inicial; T14: tiempo final).

oral (Figura 1). En concreto, el número de especies (riqueza) y su diversidad (índice de Shannon) se mantuvieron constantes a lo largo del tratamiento en ambos grupos de ensayo, tanto en el grupo “placebo” como en el “colutorio” (p-valor >0.05). Otros compuestos antimicrobianos convencionales, como la clorhexidina, sí pueden desencadenar una drástica disminución en el número y diversidad de especies microbianas, dando lugar a una marcada disbiosis<sup>20,21</sup>.

Por otro lado, la combinación O-cymen-5-OL y cloruro de zinc tampoco desencadenó una alteración en la composición del microbioma oral de los voluntarios (Figura 2). El microbioma de los voluntarios tanto del grupo “colutorio” como del grupo “placebo” se mantuvo constante a lo largo del estudio, observándose solo ligeras perturbaciones al final del estudio en grupos taxonómicos concretos (PERMANOVA p-valor > 0.05). Los microbiomas orales de los grupos “colutorio” y “placebo” se caracterizaron por presentar a lo largo del tratamiento una gran abundancia (ffi 60%) de representantes del filo *Firmicutes*, (= *Bacillota*), seguido de los filos *Proteobacteria* (= *Pseudomonadota*), *Fusobacteriota*, *Bacteroidota* y *Actinobacteriota* (Figura 3).

Solamente el filo *Fusobacteriota* presentó diferencias significativas tras el uso del colutorio formulado con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc, viéndose reducida su abundancia relativa con respecto al tiempo inicial (Figura 5). El filo *Fusobacteriota* se ha vinculado a pacientes con periodontitis<sup>22</sup>, e incluye diversos microorganismos patógenos como son *Leptotrichia* y *Fusobacterium*. Otros estudios también han demostrado que el O-cymen-5-OL presenta una actividad antimicrobiana frente a diferentes especies del

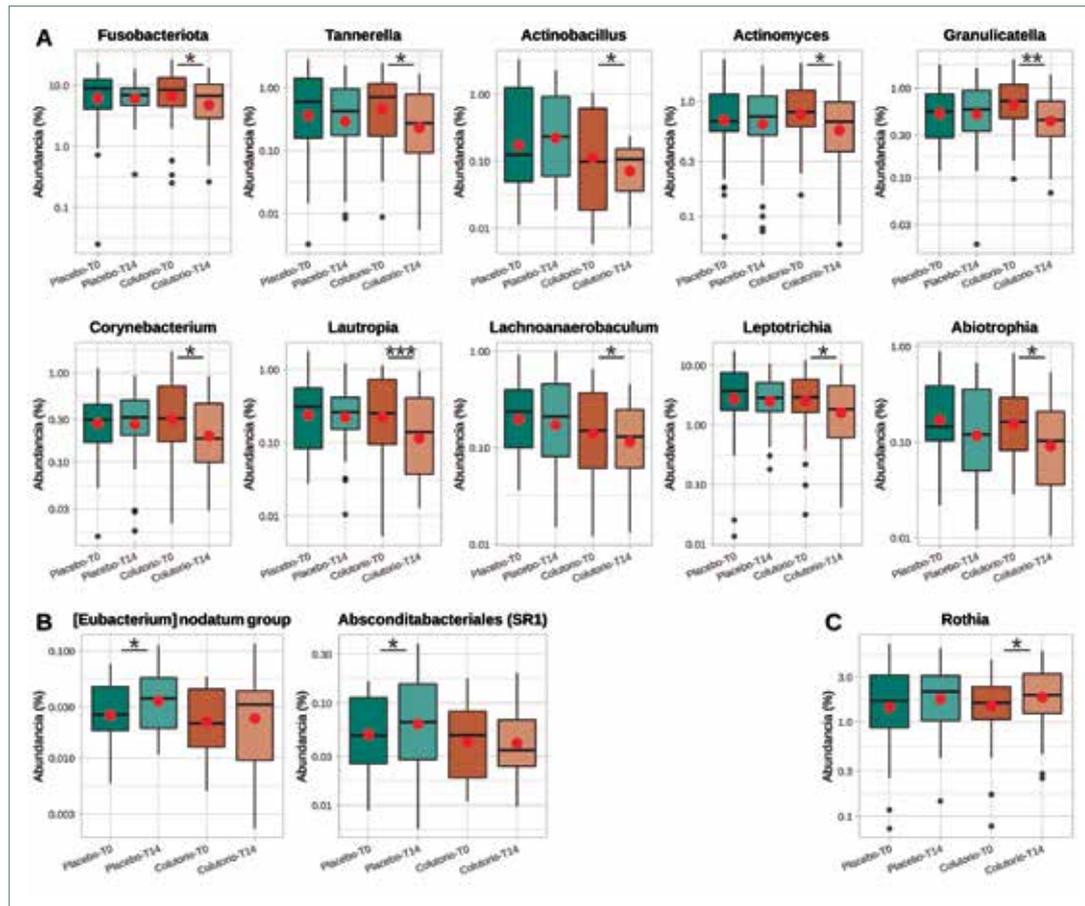
	Placebo-T0	Placebo-T14	Colutorio-T0	Colutorio-T14
Streptococcus-	38.91	43.76	39.51	46.26
Haemophilus-	11.97	9.1	11.59	9.36
Veillonella-	7.64	8.12	9.84	9.37
Gemella-	5.33	5.74	5.25	5.14
Leptotrichia-	5.25	4.31	4.78	3.22
Fusobacterium-	3.8	3.96	4.38	4.26
Rothia-	2.6	2.66	2.45	3.08
Prevotella-	2.25	1.81	2.23	1.56
Porphyromonas-	1.52	1.98	1.77	2.03
Neisseria-	2.4	1.66	1.6	1.47
Capnocytophaga-	1.26	1.96	1.23	1.16
Unknown Lactobacillales-	1.02	0.99	1.33	0.9
Actinomyces-	0.96	0.94	1.09	0.96
Actinobacillus-	1.13	0.97	1.04	0.56
Alloprevotella-	1.28	0.79	0.91	0.7
Tannerella-	0.99	0.72	0.74	0.63
Granulicatella-	0.77	0.73	0.82	0.63
Aggregatibacter-	0.82	0.75	0.71	0.48
Saccharimonadaceae-	0.61	0.75	0.58	0.52
Selenomonas-	0.69	0.63	0.66	0.32

**FIGURA 4.** Abundancias relativas (%) de los 20 géneros más abundantes identificados en los grupos de ensayo (placebo y colutorio) y en cada punto temporal (T0: tiempo inicial; T14: tiempo final).

»»» género *Fusobacterium*, incluyendo *F. nucleatum*<sup>16,18</sup>. El género bacteriano más abundante en el microbioma de los voluntarios de los grupos “colutorio” y “placebo” resultó ser *Streptococcus*, (ffi40%), seguido de *Haemophilus*, *Veillonella* y *Gemella* (Figura 4). Aunque en ambos grupos se observó un incremento

en la abundancia relativa de *Streptococcus* a lo largo del tratamiento, este incremento resultó ser no significativo ( $p$ -valor  $> 0.05$ ). Por consiguiente, la gran mayoría de bacterias del microbioma no se vieron afectadas por el uso del colutorio. Sin embargo, sí se vieron inhibidos varios géneros normalmente asociados con patología orales.

Uno de los géneros bacterianos que se vieron afectados por el uso del O-cymen-5-OL y el cloruro de zinc fue *Tannerella* ( $p$ -valor = 0.03; Figura 5A). Este género, y más concretamente la especie *T. forsythia*, es un importante patógeno conocido por provocar enfermedades periodontales, además de patologías sistémicas cardiovasculares e incluso cáncer de esófago<sup>23</sup>. De hecho, esta especie, junto con *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*, forma parte del comúnmente llamado “complejo rojo” de las infecciones periodontales. Otra bacteria que se vio afectada negativamente fue *Actinomyces* ( $p$ -valor= 0.03; Figura 5A). Este microorganismo forma parte del microbioma oral de personas sanas, pero bajo ciertas condiciones puede revertir a una fase patógena, iniciando un proceso de inflamación crónica<sup>24</sup>. Estos resultados, en consonancia con estudios previos, ponen de manifiesto la actividad antimicrobiana »»»



**FIGURA 5.** Boxplots de los géneros bacterianos que mostraron diferencias estadísticamente significativas en sus abundancias relativas (%) de después del tratamiento (\*,  $p$ -valor  $< 0.05$ ; \*\*,  $p$ -valor  $< 0.01$ ; \*\*\*,  $p$ -valor  $< 0.001$ ). A) géneros que redujeron su abundancia relativa tras el uso del colutorio; B) géneros que aumentaron su presencia tras el uso del placebo; C) géneros que aumentaron su presencia tras el uso del colutorio.

»» del O-cymen-5-OL frente a diferentes especies patógenas de *Actinomyces*, como son *A. naeslundii* y *A. viscosus*<sup>79</sup>. Otros géneros bacterianos que se vieron negativamente afectados por uso del colutorio fueron *Granulicatella* ( $p$ -valor  $< 0.01$ ) y *Abiotrophia* ( $p$ -valor = 0.02), dos patobiontes de la boca vinculados a endocarditis e infecciones pulmonares, oculares y del sistema nervioso central<sup>25</sup>; *Lachnoanaerobaculum* ( $p$ -valor = 0.03), un microorganismo asociado a enfermedades periodontales<sup>26</sup>; y *Lautropia* ( $p$ -valor  $< 0.01$ ), responsable de la peritonitis asociada a procesos de diálisis<sup>27</sup> (Figura 5A). Por otro lado, *Eubacterium*, y más concretamente el grupo *nodatum*, es un microorganismo vinculado tradicionalmente con infecciones periodontales<sup>28</sup>, y Absconditabacteriales (SR1) se asocia con el desarrollo de caries<sup>29</sup>. El análisis taxonómico mostró que, mientras que estos dos géneros aumentaron sus abundancias a lo largo del tratamiento en el grupo “placebo” ( $p$ -valor igual a 0.03 y 0.04, respectivamente; Figura 5B), no lo hicieron en los voluntarios que fueron tratados con el colutorio, lo que sugiere que el colutorio puede evitar la proliferación de estos dos grupos taxonómicos. Por consiguiente, nuestros resultados demuestran que el colutorio formulado con O-cymen-5-OL en combinación y cloruro de zinc no desencadena una alteración del microbioma oral. Sin embargo, si tiene un efecto negativo frente a determinados microorganismos potencialmente patógenos. Además, el uso del colutorio presentó un efecto positivo frente a enfermedades sistémicas. En concreto, sólo en aquellos voluntarios tratados con el colutorio se observó un aumento significativo de representantes del género *Rothia* ( $p$ -valor  $< 0.05$ ; Figura 5C). Este género se caracteriza por ser productor de óxido nítrico, siendo por consiguiente beneficioso para controlar la hipertensión y diabetes<sup>30</sup>.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha demostrado que la formulación de un colutorio con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc no modifica el microbioma oral en personas sanas. Sin embargo, ha demostrado tener un efecto beneficioso al inhibir de manera específica determinados microorganismos patógenos frecuentemente relacionados con patologías orales, incluyendo miembros de filo *Fusobacteriota* y de los géneros *Prevotella*, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Lautropia*, *Lachnoanaerobaculum*, *Eubacterium* (grupo *nodatum*) y *Absconditabacteriales* (SR1). Además, el uso del colutorio fomenta el crecimiento de *Rothia*, género beneficioso para la salud oral y la regulación de la presión sanguínea y la diabetes. Por tanto, estos resulta-

dos evidencian los beneficios de formular colutorios con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc, constituyendo una alternativa al uso de antimicrobianos convencionales para prevenir patologías orales y mantener el microbioma oral saludable. Este es el primer estudio en el que se ha evaluado el efecto de un colutorio formulado con O-cymen-5-OL y cloruro de zinc sobre el microbioma oral en personas sanas.

**Conflictos de interés:** Ninguno de los autores tiene conflictos de interés.

**Financiación:** El estudio y la preparación del manuscrito fueron financiados por Lacer S.A. (Barcelona, España).

## REFERENCIAS

1. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):122-8.
2. Wilson M. Bacteriology of Humans: An Ecological Perspective. John Wiley & Sons; 2009. 364 p.
3. Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent J.* 2018;6(2):10.
4. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, et al. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent.* 2021;113:103768.
5. Kumar M, Prakash S, Radha, et al. Beneficial Role of Antioxidant Secondary Metabolites from Medicinal Plants in Maintaining Oral Health. *Antioxidants.* 2021;10(7):1061.
6. Pizzey RL, Marquis RE, Bradshaw DJ. Antimicrobial effects of o-cymen-5-ol and zinc, alone & in combination in simple solutions and toothpaste formulations. *Int Dent J.* 2011;61:33-40.
7. Churchley D, Newby CS, Willson R, Haider A, Schemehorn B, Lynch RJM. Protection against enamel demineralisation using toothpastes containing o-cymen-5-ol, zinc chloride and sodium fluoride. *Int Dent J.* 2011;61:55-9.
8. Mira FJ, Denche M., Vivancos F, Zaldívar I. Eficacia frente al sangrado gingival de una pasta dental con o-cymen-5-ol. *Cient Dent.* 2020;17(1):41-8.
9. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1.
10. Satari L, Guillén A, Vidal-Verdú À, Porcar M. The wasted chewing gum bacteriome. *Sci Rep.* 2020;10(1):16846.
11. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852-7.
12. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D590-596.

13. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61217.
14. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al. Community ecology package. R package version. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. 2010.
15. Kakar A, Newby EE, Ghosh S, Butler A, Bosma ML. A randomised clinical trial to assess maintenance of gingival health by a novel gel to foam dentifrice containing 0.1%w/w o-cymen-5-ol, 0.6%w/w zinc chloride. *Int Dent J*. 2011;61:21-7.
16. Kakar A, Newby EE, Kakar K, Ghosh S, Targett D, Bosma ML. A randomised clinical trial to assess maintenance of gingival health by a novel dentifrice containing 0.1%w/w o-cymen-5-ol and 0.6%w/w zinc chloride. *Int Dent J*. 2011;61:13-20.
17. Payne D, Gordon JJ, Nisbet S, Karwal R, Bosma ML. A randomised clinical trial to assess control of oral malodour by a novel dentifrice containing 0.1%w/w o-cymen-5-ol, 0.6%w/w zinc chloride. *Int Dent J*. 2011;61:60-6.
18. Kunarti S, Subiwahjudi A, Dewi R, Yuanita T. Comparison of IPMP, Chlorine Dioxide and Chlorhexidine Gluconat Contained in Mouthwashes for Reducing Exopolysaccharide on Streptococcus Mutans Biofilms. International Medical Device and Technology Conference. 2017.
19. Takinami, H. Effets d'agents antimicrobiens sur un modèle de biofilm dentaire in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Génova. Facultad de Medicina. Génova, 2007.
20. Bescos R, Ashworth A, Cutler C, et al. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Sci Rep*. 2020;10(1):5254.
21. Pragman AA, Fieberg AM, Reilly CS, Wendt C. Chlorhexidine oral rinses for symptomatic COPD: a randomised, blind, placebo-controlled preliminary study. *BMJ Open*. 2021;11(12):e050271.
22. Kawamoto D, Borges R, Ribeiro RA, et al. Oral Dysbiosis in Severe Forms of Periodontitis Is Associated With Gut Dysbiosis and Correlated With Salivary Inflammatory Mediators: A Preliminary Study. *Front Oral Health*. 2021;2:722495.
23. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the «red complex», a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38(1):72-122.
24. Acar B, Çağlayan F, Inkaya AÇ, Kurtulan O. Actinomyces-associated Lesions Located in the Gingiva: Case Report of Rare Gingival Lesions. *Contemp Clin Dent*. 2017;8(1):182-4.
25. Shailaja TS, Sathivathy KA, Unni G. Infective endocarditis caused by *Granulicatella adiacens*. *Indian Heart J*. 2013;65(4):447-9.
26. Acharya A, Chen T, Chan Y, Watt RM, Jin L, Mattheos N. Species-Level Salivary Microbial Indicators of Well-Resolved Periodontitis: A Preliminary Investigation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:347.
27. Cruz GC, Sousa M, Vilela S, Costa FT e, Silva FJ. Lautropia mirabilis: An Exceedingly Rare Cause of Peritoneal Dialysis-Associated Peritonitis. *CND*. 2022;12(2):81-4.
28. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of Eubacterium nodatum and Treponema denticola with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(5):269-82.
29. Lee E, Park S, Um S, et al. Microbiome of Saliva and Plaque in Children According to Age and Dental Caries Experience. *Diagnostics*. 2021;11(8):1324.
30. Rosier BT, Moya-Gonzalvez EM, Corell-Escuin P, Mira A. Isolation and Characterization of Nitrate-Reducing Bacteria as Potential Probiotics for Oral and Systemic Health. *Front Microbiol*. 2020;11.