



Orinoquia

ISSN: 0121-3709

orinoquiacolombiana@hotmail.com

Universidad de Los Llanos

Colombia

Torrenegra-Alarcón, Miladys; Granados-Conde, Clemente; Durán-Lengua, Marlene; León-Méndez, Glicerio; Yáñez-Rueda, Xiomara; Martínez, César; Pájaro-Castro, Nerlis
Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*

Orinoquia, vol. 20, núm. 1, enero-junio, 2016, pp. 69-74

Universidad de Los Llanos

Meta, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89647074008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*

The chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Minthostachys mollis*

Química Composição e Atividade Antibacteriana Óleo Essencial de *Minthostachys mollis*

Miladys Torrenegra-Alarcón¹, Clemente Granados-Conde², Marlene Durán-Lengua³, Glicerio León-Méndez⁴, Xiomara Yáñez-Rueda⁵, César Martínez⁶, Nerlis Pájaro-Castro⁷

¹ Ing. Alim, MSc, Centro de Comercio y Servicios, Regional Bolívar. SENA. Grupo de Investigación de Biotecnología e Innovación –GIBEL-, Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación en Ingeniería, Innovación, Calidad Alimentaria y Salud-INCAS-

² Ing. Alim, MSc, Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación en Ingeniería, Innovación, Calidad Alimentaria y Salud-INCAS-

³ Bact, MSc, PhD Facultad de Medicina, Universidad de Cartagena.

⁴ Químico Farmacéutico, MSc(C), Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimentos –GITFCA-

⁵ Lic. Ciencias, MSc, PhD, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV)

⁶ Mic. Ind, Esp, Fundación Universitaria Tecnológico de Comfenalco.

⁷ QF, MSc, PhD (C) Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Sucre. Grupo de Ciencias Médicas y Farmacéuticas
Email: mtorrenegraa@hotmail.com

Recibido: enero 25 de 2014

Aceptado: mayo 23 de 2016

Resumen

Se evaluó la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial *Minthostachys mollis* cultivado en el departamento de Norte de Santander, Colombia. El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación convencional, a partir de las hojas; se determinó densidad relativa a 20°C, índice de refracción; solubilidad de los aceites esenciales en etanol (70% v/v) y rotación óptica. La composición química se evaluó mediante cromatografía de gases/espectrómetro de masa. La actividad se realizó sobre tres bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para determinar la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria, los aceites se diluyeron hasta la concentración deseada (1000–50 µg/mL) empleando el método de microdilución en caldo, y se empleó el lector de microplacas para la cuantificación del crecimiento bacteriano. El rendimiento fue de 0,6%. Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron que las bacterias fueron sensibles al aceite esencial de *Minthostachys mollis*; además, este aceite presentó un elevado contenido de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antibacteriana, como son el carvacrol y el timol. En función de los resultados obtenidos, concluimos que la especie vegetal evaluada es promisorio para el control del componente bacteriano.

Palabras clave: Muña, aceite esencial, actividad antibacteriana.

Abstract

The chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Minthostachys mollis* were evaluated; the plants were grown in the Norte de Santander department, Colombia. The essential oil was obtained by conventional hydrodistillation from *Minthostachys mollis* leaves; relative density was determined at 20°C, as were the refraction index, essential oil solubility in ethanol (70% v/v) and optical rotation. Chemical composition was evaluated by gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Three bacteria were used for evaluating antibacterial activity: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The oil was diluted to the desired concentration (1,000-50 µg/mL) for determining antibacterial sensitivity and minimum inhibitory concentration, using the broth microdilution method, and a microplate reader was used for quantifying bacterial growth. Yield was 0.6%. Sensitivity test results revealed that bacteria were sensitive to essential oil from *Minthostachys mollis*; furthermore, this oil had a high content of oxygenated monoterpenes (i.e. carvacrol and thymol) having recognised antibacterial activity. It can thus be concluded that the vegetal species evaluated here is promising for controlling bacteria.

Key words: Muña, essential oil, antibacterial activity.

Resumo

Avaliou-se a composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial *Minthostachys mollis* cultivada no departamento de Norte de Santander, Colômbia. O óleo essencial foi obtido por destilação convencional das folhas; determinada densidade relativa a 20°C, índice de refração; solubilidade de óleos essenciais em álcool etílico (70% v/v) e rotação óptica. A composição química foi avaliada utilizando o espectrômetro de massa/cromatógrafo. O evento foi realizado para três bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Para determinar a sensibilidade antibacteriana e a concentração inibitória mínima, óleos são diluídos para a concentração desejada (1000-50 µg/mL), utilizando o método de microdiluição em caldo, e usado o leitor de microplacas para a quantificação do crescimento bacteriano. O rendimento foi de 0,6%. Os resultados do teste de sensibilidade mostraram que as bactérias foram sensíveis para o óleo essencial de *Minthostachys mollis*; Além disso, este óleo apresenta um alto teor de monoterpenos, oxigenados com atividade antibacteriana conhecida, tais como o carvacrol e timol. Dependendo dos resultados, podemos concluir que as espécies de plantas avaliadas é promissora para o controle do componente bacteriano.

Palavras-chave: Muña, óleo essencial, atividade antibacteriana.

Introducción

Colombia es un país que posee una gran diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que su vegetación sea muy variada, enriquecida con especies endémicas y diversidad genética muy alta, entre las cuales se tienen algunas que poseen aceites esenciales (AE) con principios activos con potencial actividad biológica e industrial, que convierten a nuestro país en una región muy interesante para la investigación y desarrollo de nuevos productos naturales (Granados *et al.*, 2012; Torrenegra *et al.*, 2015a).

Los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras (Matiz *et al.*, 2012a). En particular, el AE de la especie vegetal *Minthostachys mollis* Griseb pertenece al género *Minthostachys* conocida comúnmente como muña, es una especie de planta arbustiva leñosa, oriunda de Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, utilizada en medicina popular para tratar los cólicos estomacales y ciertos trastornos gripales (Carhuapoma *et al.*, 2009; Torrenegra *et al.*, 2015a).

Adicionalmente, hoy por hoy, la tendencia de los pacientes se inclina hacia el consumo de “fitoter-

péuticos”, libres de productos de síntesis y aditivos químicos por lo que resulta interesante estudiar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales (AE) de plantas nativas.

En este trabajo, se obtuvo el AE, mediante hidrodestilación de la especie vegetal *Minthostachys mollis*, cultivada en el departamento de Norte de Santander (Colombia); y se determinó la composición química, la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* del AE sobre tres bacterias: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Materiales y métodos

Las muestras de muña fueron recolectadas en el municipio de Pamplona en Norte de Santander - Colombia (7°22'34"N 72°38'54"O). Cabe resaltar que la etapa de muestreo de la especie vegetal, se llevó a cabo durante la puesta del sol, para evitar que las altas temperaturas pudieran volatizar algunos componentes presentes en las muestras. El material vegetal se empacó en un contenedor de poliestireno expandido y se preservó a 25°C (Granados *et al.*, 2012). El material vegetal fue identificado en el Herbario Regional

Catatumbo-Sarare (HECASE) de la Universidad de Pamplona, registro nacional de colecciones biológicas. El número de colección de dicha planta fue conservado con N° de colección Granados C. N°01.

Procesamiento del material vegetal

Las hojas colectadas fueron lavadas con agua y seleccionadas para garantizar buen estado; seguidamente se trocearon, pesaron y procesaron inmediatamente. La extracción del AE de las hojas se realizó por hidrodestilación convencional (HD). Se empleó un equipo de hidrodestilación con capacidad para 4 L, 500 g del material vegetal, seleccionado y troceado, se introdujeron en el balón de extracción, el cual contenía 500 mL de agua destilada; el tiempo de extracción fue de 3–4 horas. El AE se colectó en un recipiente tipo Dean Stark. El AE se separó por decantación e inmediatamente fue almacenado en un vial ámbar de 4 mL (Torrenegra *et al.*, 2015b).

Determinación de propiedades físicas del AE

A cada muestra de AE se le midieron las siguientes propiedades físicas: a) densidad relativa a 20 °C; b) índice de refracción; c) solubilidad del AE en etanol (70 % v/v): en un tubo de plástico con tapa de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70 % (v/v) y 2 µL del AE. La mezcla se homogenizó en un vórtex a 200 rpm hasta obtener una solución homogénea (Torrenegra *et al.*, 2015b).

Análisis del AE por cromatografía de gases/espectrómetro de masa (CG/EM)

Se empleó un equipo CG/EM 7890A/5975C Agilent (Estados Unidos) en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Las condiciones de operación fueron: columna capilar HP-5MS (5% phenyl methyl silox, 30 m x 250 µm x 0,25 µm), temperatura inicial 45°C, temperatura de la línea de transferencia de 280°C y volumen de inyección 1,0 µL en modo split (20:1), con temperatura del inyector de 250°C. La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas, en cada tiempo de retención, con los reportados en la base de datos NIST-2008 (Tomy *et al.*, 1997; Baharum *et al.*, 2010; León *et al.*, 2015; (Torrenegra *et al.*, 2015b).

Actividad antibacteriana in vitro

Los inóculos bacterianos se prepararon de acuerdo a las indicaciones establecidas por el Instituto de están-

dares clínicos y de laboratorio (CLSI, 2011), tomando entre 3–4 colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares de las bacterias previamente sembradas en placas Petri con el agar específico, y luego suspendiéndolas en tubos de ensayo en caldo homólogo estéril, para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* se utilizó Tripticasa Soya (TSA). La incubación se realizó a 35±2 °C y se verificó sistemáticamente la densidad óptica (DO) a 620 nm en lector de microplacas (*Multiscan EX Thermo*®, Estados Unidos) hasta que la suspensión bacteriana alcanzara una DO₆₂₀ entre 0,08–0,1 unidades, equivalente a 0,5 en la escala de *McFarland* (1x10⁸ UFC/mL); la suspensión fue diluida a fin de obtener una suspensión de trabajo de 5x10⁵ UFC/mL en los ensayos biológicos. Las cepas se inocularon en el momento de mayor densidad óptica. Para ello, 0,1 mL de inóculo diluido fue adicionado a 9,9 mL del caldo específico, e incubado a 35±2 °C y verificando, a intervalos regulares la DO₆₂₀ de la suspensión bacteriana en lector de microplacas. El tiempo en el que se logró el mayor valor, se empleó como tiempo de incubación en todos los ensayos. Debido a la insolubilidad en agua de los AE, se utilizaron mezclas de caldo: etanol: *Tween*–80. Para este estudio, diferentes mezclas de etanol: caldo:tween–80 se incubaron con las cepas bacterianas en placas de 96 pocillos a 35±2 °C por el tiempo definido para cada bacteria según las curvas de crecimiento; posteriormente, se determinaron los porcentajes de viabilidad frente al blanco de máximo crecimiento (caldo con inóculo), con el objeto de seleccionar la mezcla más adecuada. Para la evaluación de la sensibilidad antibacteriana se prepararon soluciones de AE a concentración de 1000 µg/mL, acorde con el criterio de *Gibbons* que considera como promisorios los productos que presenten valores de CMI inferior a 1 000 µg/mL. Estas soluciones se incubaron con las suspensiones bacterianas a 35±2 °C, utilizando gentamicina sulfato (0,016 mg/mL) como control positivo de actividad antibacteriana. Al final del periodo de incubación, las placas se agitaron durante 5 min a 100 rpm, se determinó la DO₆₂₀ en lector de microplacas y se estimó la viabilidad por comparación frente al blanco de máximo crecimiento (Gibbons 2005; Ramírez *et al.*, 2009; Matiz *et al.*, 2015b; (Torrenegra *et al.*, 2015b).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Cincuenta µL de las suspensiones de las cepas fueron incubadas en placas de 96 pozos, con 50 µL de concentraciones seriadas entre 1 000 y 50 partes por millón (ppm) de los aceites esenciales evaluados. Las placas fueron selladas durante la incubación para reducir la evaporación. Al finalizar, se agitaron (100 rpm, 5

min) y se determinó la DO₆₂₀ en lector de microplacas. La CMI (ppm) se calculó como la mínima concentración del aceite esencial que inhibió completamente el crecimiento, comparando contra pozos de caldo puro. Pozos con caldo inoculado (máximo crecimiento) y con gentamicina (30 ppm) se emplearon como control (Matiz *et al.*, 2015b; (Torrenegra *et al.*, 2015b).

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm DE (desviación estándar). Las diferencias significativas se determinaron mediante análisis de *t de student*.

Resultados y discusión

La eficiencia de la extracción, las propiedades físicas del AE se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas del AE de *M. mollis*

Análisis	<i>M. mollis</i>
Rendimiento del AE	0,6 \pm 0,05%
Densidad específica 20°C	0,90 \pm 0,05g/mL
Índice de refracción 20°C	1,4774 \pm 0,02
Solubilidad en etanol al 70%	Positiva

El AE de la especie vegetal obtenido por el método de extracción presento un olor intenso y característico, líquidos a temperatura ambiente, arrastrable por vapor de agua e insolubles en ella, coloración amarillo pálido.

Cano *et al.*, 2008, obtuvieron un rendimiento del 0,19% por el método de arrastre con vapor de agua, muy inferior al reportado en el presente estudio (0,6%) esto se debe principalmente a los siguientes factores: métodos de cultivo, condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura; época de recolección y edad de las plantas.

Torrenegra *et al.*, 2015a, indicaron que a mayor índice de refracción el AE contendrá mayores terpenos benzenicos. Según este criterio el aceite esencial posee ligeramente más compuestos terpénicos.

La literatura científica menciona que valores mayores a 1,00 indican la presencia de terpenos aromáticos, nitrogenados y azufrados; en cambio, valores menores, incluso cercanos a 0,840, atestiguan la presencia de hidrocarburos aromáticos. Estos datos muestran que

el aceite esencial posee mayores terpenos oxigenados (Torrenegra *et al.*, 2015a).

La prueba de solubilidad en etanol al 70% fue positiva para los diferentes AE obtenidos ambos métodos. El comportamiento de solubilidad es semejante al reportado por Torrenegra *et al.*, 2015a; lo anterior, se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria.

La identificación de los componentes, los tiempos de retención y porcentajes de abundancia del AE de *M. mollis* (muña) por CG/EM son reportados en la tabla 2. El compuesto mayoritario encontrado es el carvacrol con un porcentaje de abundancia relativa de 21,24 %.

Tabla 2. Componentes mayoritarios detectados en el AE de *M. mollis*.

Compuesto	% Abundancia relativa, (tr, min)
	<i>M. mollis</i>
α -pineno	1,73 (7,34)
Limoneno	0,56 (10)
Carvacrol	21,24 (10,07)
Eucaliptol	10,04 (10,07)
Timol	13,11 (13)
Pulegona	9,84 (41)
Germacreno-D	11,85 (44,36)
Biciclogermacreno	1,83 (44,803)
Acetato de cariofileno	1,83 (45,7)
Longifolol	1,77 (46,11)
Acetato de α -Eudesmol	11,32 (47,588)
Acetato de (-)-Isolongifolol	10,94 (48,75)
Acetato de exo-Norbornanol	3,94 (49,87)

Tiempo de retención (tr) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST - 2008.

Cano *et al.*, 2008, encontraron como componente mayoritario del aceite esencial de Muña al pulegona (36,68%). Resaltado que este compuesto está presente en el perfil cromatográfico mostrados en la tabla 2.

Sin embargo, es visible una pequeña variación con respecto a los componentes minoritarios encontrados por Cano *et al.*, 2008, ocasionado por el efecto de diferentes factores ambientales sobre el contenido de compuestos en plantas medicinales. La intensidad de la luz y el fotoperíodo, que varían de región en región; época de recolección y edad de las plantas afectan la composición del aceite esencial.

Los ensayos de crecimiento revelaron que las cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* alcanzaron la mayor DO₆₂₀ a las 20 horas, estos fueron los tiempos de punto final de incubación en los bioensayos de actividad antibacteriana. Para solubilizar los aceites, se demostró que las mezclas que contenían etanol al 4 % y polisorbato-80 al 1 % no inhibieron el crecimiento de ninguna de las cepas, por tanto, se eligió utilizar un sistema caldo: etanol: polisorbato-80 en proporción 95:4:1, para solubilizar el aceites esenciales evaluado en este trabajo.

Los resultados de la evaluación de la sensibilidad antibacteriana del AE (tabla 3), permitió escoger el aceite en estudio, tomando como criterio de selección, que fuera capaz de inhibir en más de un 90% a las tres cepas. La cepa menos sensible a los aceites fue la *S. epidermidis*.

La CMI se determina con la utilización de caldo inoculado y estandarizado, al que se adicionan soluciones de aceites a diferentes concentraciones, provocando

una dilución; esto explica el por qué la absorbancia (DO₆₂₀) del caldo puro es mayor que la de los demás pozos al tiempo inicial de incubación. Al final de la misma, se leen las absorbancias de todos los pozos. Se considera inhibición total, en aquellos con valores inferiores al del caldo puro. La mayor concentración de aceite capaz de lograr esto, se denomina CMI. Los valores se presentan en la tabla 4.

Se reconoce que los AE dependen de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadas a nivel de membrana, por ej. Ciertos componentes del AE pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir por la fosforilación del ADP (Cano *et al.*, 2008).

En particular, este AE presentó la mayor concentración relativa del compuesto carvacrol, el cual puede penetrar la membrana del citoplasma, causando una desestabilización de esta; igualmente podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana (Xu *et al.*, 2008).

De esta manera se sigue sumando evidencia sosteniendo que los AE, son una buena fuente natural y disponible que posibilitará desarrollar diferentes formas farmacéuticas con actividad farmacológica definida. Por otro lado, estos resultados pueden servir para comenzar a entender las razones del extenso uso de los aceites esenciales, ya sean en la medicina tradicional o en la aromaterapia, al mismo tiempo podemos acercarnos cada vez más a la utilización de las plantas

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de crecimiento obtenidos en la prueba de sensibilidad bacteriana del aceite esencial (1000 µg/mL) frente a tres cepas bacterianas.

Aceite esencial	Cepas bacterianas		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
Gentamicina (Control)	98,5±0,05	98,3±0,02	98,9±0,03
<i>M. mollis</i>	92,8±0,90	90,5±0,33	91,8±0,50

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial frente a tres cepas bacterianas.

Aceite esencial	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>
<i>M. mollis</i>	500	600	500

aromáticas, que contienen AE, como terapia complementaria de las convencionales.

Conclusiones

Las cepas bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli*, resultaron susceptibles a la acción antibacteriana del AE de *M. mollis* extraído por el método de hidrodestilación; lo cual, convierte a este AE, cuyo principal constituyente es el agente antimicrobiano carvacrol, como promisorio para el control del componente bacteriano.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las Universidades de Pamplona, Cartagena y Sucre e igualmente al SENA -Centro de Comercio y Servicios, Regional Bolívar-, por facilitar espacio, recursos y tiempo de los investigadores.

Bibliografía

- Baharum SN, Bunawan H, Ghani MaA, Mustapha WAW, Noor NM. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS). *Molecules*. 2010;15(10):7006-7015.
- Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (MUÑA): *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008;25(3):298-301.
- Carhuapoma M, López S, Roque M, Velapatiño B, Bell C, Whu D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "Ruyaq Muña". *Ciencia e Investigación*. 2009;12(2):83-89.
- CLSI. Performance standards for Antimicrobial susceptibility testing, 21st international supplements. CLSI Document M100-S21. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Gibbons S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and antiinfective agents. *Phytochem Rev*. 2005;4(1):63-78.
- Granados C, Yáñez Y, Santafé G. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. 2012;10(1):12-23.
- León G, Osorio MR, Martínez SR. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus Sinensis* L. *Rev Cuba Farm*. 2015;49(4):742-750.
- Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. *Biomédica* 2012;32:125-133.
- Matiz G, Osorio M, León G. Actividad antibacteriana *in vitro* de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné, *Rev Cubana Farm*. 2015;49(1):103-116.
- Ramírez A, Stella L, Marín D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 2009;15(42):263-268.
- Tomy GT, Stern GA, Muir DC, Fisk AT, Cymbalisty CD, Westmore JB. Quantifying C₁₀-C₁₃ polychloroalkanes in environmental samples by highresolution gas chromatography/electron capture negative ion high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem*. 1997;69(14):2762-71.
- Torrenegra M, Granados C, Osorio M, León G. Method comparison of hydrodistillation microwave radiation-assisted (MWHd) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*. *Inf Tecnol*. 2015;26(1):117-122.
- Torrenegra M, Matiz G, León G. Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Rev Cubana Farm*. 2015;49(3): 512-523.
- Xu J, Zhou F, Ji B, Pei R, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47(3):174-9.