



Actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a patógenos orales

Antimicrobial activity of fractions obtained from essential oil of *Minthostachys mollis* against oral pathogens

[Marco Antonio Sánchez-Tito](#)^{1*} / [Ingrit Collantes-Díaz](#)²

¹Universidad Privada de Tacna, Escuela Profesional de Odontología. Tacna, Perú.

²Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería Química y Textil. Lima, Perú.

*Autor para la correspondencia: marcosanchez2183@gmail.com

Recibido: 15/02/2021. Aprobado: 04/05/2021

Cómo citar este artículo

Sánchez-Tito MA, Collantes-Díaz I. Actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a patógenos orales. Rev haban cienc méd [Internet]. 2021 [citado]; 20(4):e3971. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/3971>

RESUMEN

Introducción: El aceite esencial de *Minthostachys mollis* ha demostrado poseer importantes propiedades antimicrobianas.

Objetivo: Caracterizar químicamente las fracciones obtenidas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* y evaluar la actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*.

Material y Métodos: Las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y metanol del AE de *M. mollis* fueron caracterizadas químicamente por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Las repeticiones del ensayo antimicrobiano se calcularon con el programa EPIDAT v.4.2. La actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión de disco y se calculó la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución. Los datos fueron analizados empleando la prueba ANOVA ($p=0,05$).

Resultados: Los principales constituyentes de las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y metanol fueron cis-Menthone (39,8 %), thymol (31,2 %) y α -Terpineol (43,6 %), respectivamente. Todas las cepas fueron sensibles a las tres fracciones, aunque *C. albicans* fue la cepa más sensible, registrando halos de inhibición de 14,73 \pm 0,57 mm para la fracción de metanol, 20,91 \pm 0,55 mm para éter de petróleo y 20,38 \pm 0,58 mm para diclorometano, se encontraron diferencias significativas cuando se compararon frente a Clorhexidina al 0,12 % y Nistatina ($p<0,05$). Las concentraciones mínimas inhibitorias de las fracciones variaron de 0,2 a 3,2 μ g/mL.

Conclusiones: Los principales constituyentes de las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y metanol fueron cis-Menthone, thymol y α -Terpineol. Las fracciones de éter de petróleo y diclorometano fueron altamente efectivas para inhibir el crecimiento de *S. mutans*, *L. acidophilus*, *E. faecalis*, *P. gingivalis* y *C. albicans*.

Palabras claves:

Aceite esencial; composición química; fraccionamiento; agentes antibacterianos.

ABSTRACT

Introduction: The essential oil of *Minthostachys mollis* has demonstrated to have important antimicrobial properties.

Objective: To chemically characterize the fractions obtained from the essential oil of *Minthostachys mollis* and to evaluate the antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans*.

Material and Methods: The petroleum ether, dichloromethane and methanol fractions of the AE of *M. mollis* were chemically characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The repetitions of the antimicrobial test were calculated using the EPIDAT v.4.2 program. The antimicrobial activity was performed by the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration was calculated by the microdilution method. The data were analyzed using the ANOVA test ($p=0.05$).

Results: The main constituents of the petroleum ether, dichloromethane and methanol fractions were cis-Menthone (39,8 %), thymol (31,2 %) and α -Terpineol (43,6 %), respectively. All strains were sensitive to the three fractions, although *C. albicans* was the most sensitive strain, registering inhibition halos of 14,73 \pm 0.57 mm for the methanol fraction, 20,91 \pm 0.55 mm for petroleum ether and 20.38 \pm 0.58 mm for dichloromethane, finding significant differences when compared to 0,12 % Chlorhexidine and Nystatin ($p<0,05$). The minimum inhibitory concentrations of the fractions ranged from 0,2 to 3,2 μ g/mL.

Conclusions: The main constituents of the petroleum ether, dichloromethane and methanol fractions were cis-Menthone, thymol and α -Terpineol. The petroleum ether and dichloromethane fractions were highly effective in inhibiting the growth of *S. mutans*, *L. acidophilus*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, and *C. albicans*.

Keywords:

Essential oil; chemical composition; fractionation; antibacterial agents.



INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales forma parte del conocimiento tradicional de diversas culturas alrededor del mundo.⁽¹⁾ *Minthostachys mollis* conocida como “muña” es usada tradicionalmente por sus propiedades anti-inflamatorias, y antibacterianas.^(2,3) *M. mollis* pertenece a la familia *Lamiaceae* y es un arbusto perenne que se distribuye entre los 2500 a 3500 m.s.n.m. en los valles de toda la región andina de América del Sur.⁽⁴⁾

Los principales derivados de las plantas aromáticas son los aceites esenciales (AEs) y sus propiedades corresponden a sus metabolitos secundarios lipofílicos altamente volátiles.⁽⁵⁾ Los principales componentes químicos aislados del aceite esencial (AE) de *M. mollis* son mentol, mentona, pulegona, carvacrol, eucaliptol y timol.^(6,7,8,9,10) Se sabe que la composición química y las propiedades farmacológicas de los AEs dependen de factores como las condiciones geográficas y ambientales, el tiempo de recolección y los métodos empleados para su aislamiento.^(5,11)

Diversas investigaciones han evaluado el efecto antimicrobiano del AE de *M. mollis* frente a especies como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando poseer una importante actividad inhibitoria.^(6,7,8,9) También se ha verificado su efecto antimicrobiano frente a algunas especies de importancia odontológica como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Actinomyces sp* y *Porphyromonas gingivalis*.^(12,13,14)

En la cavidad bucal se han reconocido más de 700 especies microbianas, y la pérdida de equilibrio puede desencadenar la aparición de enfermedades como la caries dental, enfermedad periodontal e infecciones oportunistas como candidiasis oral.^(12,13,15)

El mecanismo de acción del AE de *M. mollis* sobre los microorganismos no está dilucidado por completo, pero puede atribuirse a sus principales constituyentes como los monoterpenos que tienen la capacidad de incrementar la permeabilidad de la membrana y generar cambios en los canales de iones, causando la liberación de los componentes del citoplasma bacteriano y propiciar la muerte celular.^(16,17)

Los estudios previos han valorado la actividad antibacteriana de esta planta empleando el AE puro. A nuestro entender, no existen experiencias que hayan realizado el fraccionamiento del AE de *M. mollis*, esto es particularmente importante ya que las propiedades de algunos compuestos pueden modificarse cuando son estudiados de manera aislada.

En consecuencia, el **objetivo** del estudio fue caracterizar las fracciones de éter de petróleo, diclorometano y metanol obtenidas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* y determinar su actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio en dos etapas, la primera relacionada con la caracterización química de las fracciones obtenidas del AE de *M. mollis*, luego se realizó un estudio experimental *in vitro* para comparar su actividad antimicrobiana con la clorhexidina y nistatina frente a patógenos de importancia oral. El cálculo de las repeticiones de los ensayos se realizó con el programa EPIDAT v.4.2, comparando las medias de un estudio previo; se estableció un nivel de confianza de 95 % y un poder del 80 %; se consideraron ocho repeticiones para cada grupo.

Procedimiento

Recolección de la planta

Se recolectaron 10 kg de plantas frescas de muña proveniente de la provincia de Tarata (Tacna, Perú) en setiembre de 2019. Un espécimen de la planta fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann bajo el registro No. 3103. La muestra fue identificada como *Minthostachys mollis* (Griseb) L.

Extracción del aceite esencial y fraccionamiento

Las ramas y hojas frescas de *M. mollis* fueron sometidas al método de extracción por arrastre de vapor por 4 h a 100 °C. Se obtuvieron 40 mL de AE que fue almacenado a 2 °C. El AE de *M. mollis* fue fraccionado por el método de cromatografía en columna. Se llenó una columna de vidrio con 100 g de gel de sílice 60 (*Spectrum, Chemical MFG, Corp*) mezclado con 50 mL de éter de petróleo (Solutest, Importadora andina EIRL, Lima, Perú), inmediatamente se vertieron 25 mL del AE de *M. mollis* en la columna y fue eluido secuencialmente con 800 mL de éter de petróleo, seguido por 200 mL, 100 mL, 150 mL y 100 mL de éter de petróleo/diclorometano (9:1, 8:2, 2:1, 1:1 v/v), finalmente con 200 mL de diclorometano y 200 mL de metanol (Emsure, Merck). Los elutos fueron recolectados en frascos de 20 mL y cada fracción fue sometida a evaporación para reducir el volumen y fueron almacenados a 2 °C.

Caracterización química de las fracciones

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo (QP2010, Ultra Shimadzu) equipado con una columna de capilaridad DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las condiciones de operación fueron las siguientes: la temperatura inicial de la columna se programó a 40 °C y se mantuvo por 2 min; se calentó a 140 °C con una razón de 3 °C/min; incrementándose a 250 °C por 20 min y finalmente a 300 °C por 1 min. Se empleó helio como gas de carga y un volumen de inyección de 1,0 µL a un flujo constante de 1 mL/min.

La temperatura de la línea de transferencia se ajustó a 250 °C y el espectro de masa se obtuvo a un rango de 50-350 m/z. Los componentes fueron identificados por sus índices de retención de la serie de n-alcános homólogos comparados con los estándares de la literatura. El espectro de masa, reflejado por el número de picos en el cromatograma fue comparado con la librería NIST 08 y los datos disponibles en la literatura.

Actividad antimicrobiana

Se emplearon cepas de *S. mutans* ATCC® 25175™, *L. acidophilus* ATCC® 4356™, *E. Faecalis* ATCC® 29212™, *P. gingivalis* ATCC® 33277™ y *C. albicans* ATCC 10231™. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión de disco. Los medios empleados fueron Agar cerebro-corazón para *S. mutans* y *E. faecalis*; Agar MRS para *L. acidophilus*; Agar sangre para *P. gingivalis* y Agar TSA para *C. albicans*. Placas Petri conteniendo los medios de cultivos fueron inoculadas con una suspensión de 18 h de las cepas, con una densidad aproximada de 10⁸ UFC/mL.

Se emplearon discos de papel filtro Whatman No. 3 de 5 mm de diámetro cargados con 10 µL de cada una de las fracciones, se empleó dimetilsulfoxido (DMSO) como control negativo y Clorhexidina al 0,12 % (PERIOAID®) y Nistatina (Micotatin® 100 000 UI/mL) como controles positivos. Las placas se incubaron a 37°C por 48 h para *S. mutans*, *L. acidophilus* en condición de microaerofilia en un sistema Gaspack, para *C. albicans* y *E. faecalis* el tiempo de incubación fue similar y para *P. gingivalis* por 120 horas en condiciones de anaerobiosis estricta en el mismo sistema Gaspack. Las zonas de inhibición se midieron con un compás Vernier digital (Uberman©). Se realizaron ocho repeticiones para cada fracción y para los controles.

Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI de las fracciones frente a *S. mutans* se determinó empleando el método de microdilución en placas de 96 pozos. Se prepararon cuatro soluciones para el ensayo. La solución 1 contenía 5 mL de caldo cerebro-corazón (BHI), para las soluciones 2 a la 4 se agregó 160 µL de cada una de las fracciones (éter de petróleo, diclorometano y metanol) a tubos conteniendo 5 mL de BHI, las soluciones resultantes tuvieron una concentración de 3,2 % (v/v). Se agregaron 50 µL de la solución 1 a los pozos de las columnas 2 a la 12, para la columna 1 se agregó 100 µL de la solución 2 en las filas A-B; el mismo volumen de las soluciones 3 y 4 se agregaron para las filas C-D y E-F, respectivamente.

Con una pipeta multicanal, se transfirieron 50 µL de todas las filas de la columna 1 a la columna 2, y se realizó una dilución de 1:2 hasta la columna 11, obteniendo concentraciones de las fracciones de 3,2 a 0,003 % (v/v). Se agregó 50 µL de un inóculo de *S. mutans* con una concentración de 1x10⁸ UFC/mL a todos los pozos de las columnas 1 a 11. En la columna 12, los pozos de A-D se colocaron 50 µL de BHI y 50 µL del inóculo de *S. mutans*, que representó el control negativo, en los pozos E-H se colocó 100 µL de BHI que actuó como medio de control. Las microplacas fueron incubadas por 24 h a 37°C.

La presencia de turbidez en los pozos fue el indicador de crecimiento bacteriano; la CMI se estableció como la menor concentración en la cual no se observó turbidez. Los ensayos de CMI se repitieron para las demás cepas, considerando los medios de cultivos señalados previamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los datos fueron analizados con el programa SPSS para Mac OS versión 23.0 (*Statistical Program Software System Inc.*, Chicago, IL, EE.UU.). Se empleó la prueba ANOVA para la comparación general de los grupos. Se aplicó la prueba Tukey para las comparaciones intra-grupo. Se estableció un nivel de significancia del 5 %.

La investigación fue aprobada con resolución rectoral No. 959-2019-UPT-R en la Universidad Privada de Tacna, Perú.

RESULTADOS

Los componentes químicos y sus cantidades relativas (%) de las fracciones obtenidas del AE de *M. mollis* identificados por el análisis cromatográfico se detallan en la Tabla 1. Los principales componentes de la fracción de éter de petróleo fueron cis-menthone (39,8 %) y eucalyptol (30,2 %). En el caso de la fracción de diclorometano, el componente más abundante fue thymol (31,2 %) seguido de pulegone (25,1 %); y para la fracción de metanol fueron α-Terpineol (43,6 %) y linalool (32,9 %).

Tabla 1 - Componentes químicos identificados en las fracciones del aceite esencial de <i>M. mollis</i>					
Composición química de las fracciones del AE de <i>M. mollis</i>					
Éter de petróleo		Diclorometano		Metanol	
Componente	%	Componente	%	Componente	%
cis-Menthone	39,8	Thymol	31,2	α-Terpineol	43,6
Eucalyptol	30,2	Pulegone	25,1	Linalool	32,9
trans-Menthone	9,4	cis-p-Menthan-3-one	19,8	Borneol	13,1
O-Cymene	7,9	Isomenthone	12,6	(-)-Spathulenol	9,1
Octen-1-ol, acetate	7,7	L-4-terpineol	4,6	cis-beta-Terpineol	4,5
Isomenthone	3,4	6-ethyl-	1,9	3-Octanol	3,2
.beta.-Pinene	1,6	(-)-Spathulenol	1,9	Piperitone	2,5
		α-Terpineol	1,4		
		Eucalyptol	1,3		

Las fracciones de éter de petróleo y diclorometano mostraron una importante actividad antibacteriana en todos los microorganismos estudiados, generando halos de inhibición mayores a 17 mm. La fracción de metanol presentó una actividad antibacteriana moderada frente a las cepas, con halos de inhibición de entre 7,34 a 14,73 mm. *C. albicans* fue el microorganismo más sensible frente a las tres fracciones del AE de *M. mollis*.

La prueba ANOVA de un factor mostró diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de los halos de inhibición generado por las fracciones y los controles frente a todas las cepas estudiadas ($p < 0,05$). Aunque las comparaciones pareadas del efecto de las fracciones sobre cada una de las cepas mostraron que en algunos casos los promedios de los halos de inhibición generados fueron similares ($p > 0,05$). El detalle de las comparaciones puede observarse en la **Tabla 2**.

Tabla 2 - Ensayo de difusión de disco para la actividad antibacteriana de las fracciones del aceite esencial de <i>M. mollis</i>						
Cepa	Diámetro de halos de inhibición de las Fracciones (mm)			Control (mm)		P valor
	Éter de petróleo	Diclorometano	Metanol	Clorhexidina	Nistatina	
<i>S. mutans</i>	17,21±0,66 ^{Aa}	18,88±0,98 ^{Ab}	8,20±0,73 ^{Ac}	19,96±1,04 ^{Ad}	ND	0,01
<i>L. acidophilus</i>	17,77±0,68 ^{Aa}	19,12±0,78 ^{Ab}	7,34±0,71 ^{Ac}	20,64±1,26 ^{Bd}	ND	0,01
<i>E. faecalis</i>	19,52±0,34 ^{Ba}	19,97±0,27 ^{Ba}	11,37±0,59 ^{Bb}	20,80±1,05 ^{Bc}	ND	0,02
<i>P. gingivalis</i>	17,46±0,39 ^{Aa}	18,13±0,73 ^{Aa}	7,52±0,47 ^{Ab}	20,02±0,39 ^{Ac}	ND	0,00
<i>C. albicans</i>	20,91±0,55 ^{Ca}	20,38±0,58 ^{Ca}	14,73±0,57 ^{Cb}	ND	22,18±0,44 ^c	0,03

ND: no determinado.
Nota: Las medias con letras mayúsculas en superíndice diferentes dentro de la misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Las medias con letras minúsculas diferentes dentro de la misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

La CMI de las fracciones también varió de acuerdo con el microorganismo estudiado. La fracción de éter de petróleo presentó la menor concentración para inhibir el crecimiento de *C. albicans* (0,2 µg/mL). La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre la CMI de cada una de las fracciones respecto de las cepas microbianas estudiadas ($p < 0,05$). Las comparaciones intra-grupo entre cada una de las fracciones y las cepas reveló que la CMI en algunas de las comparaciones fue similar ($p > 0,05$). (**Tabla 3**).

Tabla 3 - Concentración mínima inhibitoria de las fracciones del aceite esencial de <i>M. mollis</i> frente a las cepas bacterianas			
Cepa	Fracciones del AE. de <i>M. mollis</i> CMI (µg/mL)		
	Éter de petróleo	Diclorometano	Metanol
<i>S. mutans</i>	1,6 ^{Aa}	0,8 ^{Ab}	3,2 ^{Ac}
<i>L. acidophilus</i>	0,8 ^{Ba}	0,8 ^{Aa}	3,2 ^{Ab}
<i>E. faecalis</i>	0,4 ^{Ca}	0,4 ^{Ba}	3,2 ^{Ab}
<i>P. gingivalis</i>	1,6 ^{Aa}	1,6 ^{Ca}	3,2 ^{Ab}
<i>C. albicans</i>	0,2 ^{Da}	0,4 ^{Bb}	1,6 ^{Bc}

Nota: Los valores de CMI con letras mayúsculas en superíndice diferentes dentro de la misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores de CMI con letras minúsculas diferentes dentro de la misma fila muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Las propiedades antimicrobianas de los derivados del AE de *M. mollis* pueden ser atribuidas a los principales compuestos químicos identificados en esta planta. Se sabe que procedimientos como el fraccionamiento de los AEs permite aislar algunos compuestos particulares en los solventes orgánicos y esto puede ser útil para estudiar de manera más precisa las propiedades antibacterianas de las plantas aromáticas.⁽¹⁸⁾

Si bien el estudio de los compuestos de los aceites esenciales es un paso primario para poder evaluar su potencial antibacteriano, es interesante poder realizar ensayos que permitan aislar de manera más detallada estos compuestos, a través de procedimientos de fraccionamiento con el uso de solventes de polaridad creciente.⁽¹⁹⁾

Las experiencias de estudios previos analizaron las propiedades antimicrobianas del AE de *M. mollis* puro y no existen antecedentes que hayan analizado la actividad antimicrobiana de fracciones obtenidas del AE de *M. mollis* frente a patógenos orales. Los resultados mostraron que la expresión de los compuestos químicos fue distinta para cada fracción. Esta variación en los porcentajes encontrados puede estar relacionada con las diferencias en la actividad antimicrobiana reportada.

Es interesante notar que la fracción de metanol fue la que presentó menor efecto antibacteriano frente a todas las cepas estudiadas, esto puede ser debido a que en esta fracción no se identificó la presencia de eucalyptol, thymol o los derivados de mentona, presentes en las fracciones de éter de petróleo y diclorometano, considerando que estas fracciones fueron efectivas para inhibir el crecimiento de todas las cepas.

Como se mencionó previamente, los distintos compuestos y sus porcentajes, principalmente monoterpenos encontrados en las fracciones de éter de petróleo y diclorometano pueden ser los responsables de la importante actividad antibacteriana frente a *S. mutans*, *L. acidophilus*, *E. Faecalis*, *P. gingivalis* y *C. albicans*, encontrada en este estudio.

Al respecto, se sabe que la actividad antibacteriana del eucalyptol se debe a que actúa sobre la membrana citoplasmática, incrementando su permeabilidad, alterando el proceso de transporte de su membrana y originando daño estructural de la célula bacteriana,⁽²⁰⁾ estas propiedades son similares para otros monoterpenos, además los grupos hidroxilos y la presencia de un sistema de electrones deslocalizados desestabilizan la membrana reduciendo el gradiente de pH y consecuentemente promueven la lisis celular, todas estas propiedades son importantes para la actividad antibacteriana propuesta para los compuestos de los aceites esenciales.^(16,17)

Por otro lado, los AEs y la composición de su trazado químico, como los monoterpenos son más efectivos sobre microorganismos gram-positivos, como cuatro de las cepas estudiadas en este estudio, incluidas *S. mutans*, *E. Faecalis*, *L. acidophilus* y *C. albicans*. En el caso de los microorganismos gram-negativos los compuestos de los AEs parecen no ser tan efectivos debido a que este tipo de microorganismos presentan una mayor cantidad de lipoproteínas y lipopolisacáridos, que dificultarían el efecto de estos constituyentes, al formar una barrera hidrofóbica a nivel de la membrana.^(16,20) Sin embargo, en este estudio *P. gingivalis*, una bacteria gram-negativa, fue sensible al efecto de las fracciones de éter de petróleo y diclorometano del AE de *M. mollis*, las CMI fueron las más altas para esta cepa.

Algunos factores como las condiciones ambientales relacionadas con la procedencia de las plantas medicinales pueden influir en su capacidad antimicrobiana frente a las diferentes especies.⁽¹¹⁾ Finalmente, es importante resaltar que los efectos esperados no son producto de un solo compuesto, sino de su combinación y acción sinérgica.

Los resultados en esta investigación están sujetos a algunas limitaciones; en primer lugar, al tratarse de un estudio *in vitro*, donde se emplearon cepas estandarizadas, es probable que el efecto no sea el mismo que podría observarse si se estudiara frente a cepas aisladas de grupos poblacionales. Adicionalmente, en este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de las distintas fracciones obtenidas a partir del AE de *M. mollis*, a través de un ensayo de difusión en disco y microdilución para cepas independientes, por lo que sería interesante poder realizar estudios futuros para evaluar el efecto sobre modelos de *biofilm*, que representan de manera más próxima lo que ocurre en el medio bucal, esto último permitirá valorar la viabilidad de los microorganismos mediante estrategias más apropiadas como el uso de microscopía confocal o análisis de biología molecular, además de evaluar la citotoxicidad frente a estirpes celulares.

CONCLUSIONES

Las fracciones de éter de petróleo y diclorometano fueron efectivas para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valenzuela Oré F, Romaní Romaní F, Monteza Facho BM, Fuentes Delgado D, Vilchez Buitron E, Salaverry García O. Prácticas culturales vinculadas al cuidado de la salud y percepción sobre la atención en establecimientos de salud en residentes de centros poblados alto-andinos de Huancavelica, Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2018 [Citado 10/08/2020];35(1):84-92. Disponible en: <https://doi:10.17843/rpmesp.2018.351.3603>
2. De la Cruz H, Vilcapoma G, Zevallos PA. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. J Ethnopharmacol [Internet]. 2007 [Citado 10/09/2020];111(2):284-94. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.jep.2006.11.018>
3. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive compounds from plants used in peruvian traditional medicine. Nat Prod Commun [Internet]. 2016 [Citado 10/09/2020];11(3):315-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27169179/>
4. De la Cruz MG, Malpartida SB, Santiafo HB, Jullian V, Bourdy G. Hot and cold: medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). J Ethnopharmacol [Internet]. 2014 [Citado 10/09/2020];155(2):1093-117. Disponible en: <https://doi:10.1016/j.jep.2014.06.042>
5. Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines (Basel) [Internet]. 2016 [Citado 10/08/2020];3(4):25. Disponible en: <https://doi:10.3390/medicines3040025>
6. Torrenegra Alarcón M, Granados Conde C, Durán Lengua M, León Méndez G, Yáñez Rueda X, Martínez C, et al. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. Orinoquia [Internet]. 2016 [Citado 10/09/2020];20(1):69-74. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-37092016000100008&script=sci_abstract&tlng=es
7. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. In vitro antifungal activity and metabolites of the essential oil of the leaves of *Minthostachys mollis* (muña) leaves. Rev Peru Med Exp Salud Pública [Internet]. 2008 [Citado 10/09/2020];25(3):298-301. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342008000300008&script=sci_abstract&tlng=en

8. Campo FM, Ambuludí FDL, Cepeda RNC, Márquez HI, San Martín GD, Cuesta RO. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb contra el *Staphylococcus aureus*. Rev Cubana Farm [Internet]. 2019 [Citado 10/09/2020];51(4):[Aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/183/175>
9. Peña SD, Gutiérrez RM. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. Revista Ciencia y Tecnología [Internet]. 2017 [Citado 10/09/2020];13(3):55-66. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/1874/1802>
10. Benites J, Guerrero Castilla A, Salas F, Martínez JL, Jara Aguilar R, Venegas Casanova EA, et al. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil Peruvian *Minthostachys mollis* Griseb. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat [Internet]. 2018 [Citado 10/09/2020];17:566-74. Disponible en: <https://revistaschilenas.uchile.cl/handle/2250/34890>
11. Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK. Essential Oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. Front Microbiol [Internet]. 2017 [Citado 10/09/2020];7:2161. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
12. Díaz LK, Moromi NH. Determinación antibacteriana in vitro de *Menthostachys mollis* (Muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Odonto Sanmarquina [Internet]. 2005 [Citado 10/09/2020];8(2):3-5. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/3137>
13. Aguilar Ancori EG, Aguilar Ancori KV, Garay B, Mamani V, Quispe Flórez MM. Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de aceites esenciales de cinco plantas alto andinas. Rev Peru Med Exp Salud Publica [Internet]. 2018 [Citado 10/09/2020];35(1):161-3. Disponible en: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3610>
14. Aigaje Sierra AI, Zurita Solís MK. Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*. Dom Cien [Internet]. 2017 [Citado 10/09/2020];3(1):3-20. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5802909>
15. Cornejo Ulloa P, van der Veen MH, Krom BP. Review: modulation of the oral microbiome by the host to promote ecological balance. Odontology [Internet]. 2019 [Citado 10/09/2020];107(4):437-48. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00413-x>
16. Oz M, Lozon Y, Sultan A, Yang KHS, Galadari S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. Pharmacol Ther [Internet]. 2015 [Citado 10/09/2020];152:83-97. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.006>
17. Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MC, Endringer DC, Fronza M, et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. Molecules [Internet]. 2019 [Citado 10/09/2020];24(13):2471. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
18. Almedia RN, Soares RP, Cassel E. Fractionation process of essential oils by batch distillation. Braz J Chem Eng [Internet]. 2018 [Citado 10/09/2020];35(3):1129-40. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322018000301129&lng=en&nrm=iso
19. Silvestre WP, Medeiros FR, Agostini F, Toss D, Pauletti GF. Fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil using vacuum fractional distillation. J Food Sci Technol [Internet]. 2019 [Citado 10/09/2020];56, 5422-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04013-z>
20. Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009 [Citado 10/09/2020];64(6):1219-25. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkp362>

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación con la investigación presentada.

Contribución de autoría

MAST: diseño y desarrollo del proyecto, realización de ensayos, análisis de resultados, elaboración del manuscrito.

ICD: realización de ensayos, análisis de datos, elaboración del manuscrito.

Ambos autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final del artículo.