

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Número Publicado el 15 de enero de 2017

DOI: 10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.1.3-20



Ciencias de la salud

Artículo Científico

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*

*Antimicrobial effectiveness of *Minthostachys mollis* (type) essential oil at 25, 50,
100% versus *Porphyromonas gingivalis**

*Efetividade antimicrobiana do óleo essencial de *Minthostachys mollis* (tipo) 25%,
50%, 100% frente a *Porphyromonas gingivalis**

Alexis I. Aigaje-Sierra¹
alexisaigaje@outlook.es

Myriam K. Zurita-Solís¹¹
kathy1zurita@hotmail.com

Recibido: 12 de noviembre de 2016 * **Corregido:** 19 de diciembre de 2016 * **Aceptado:** 02 de enero 2017

¹Odontólogo, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

¹¹Docente, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Resumen.

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana de la *Minthostachys mollis* (TIPO) un arbusto perenne de la Serranía Ecuatoriana, frente a la *Porphyromonas gingivalis* que es uno de los principales periodontopatógenos. **Materiales y métodos:** En el presente estudio de tipo experimental, prospectivo, transversa, in vitro, se elaboró un aceite esencial utilizando la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua, obteniendo 10 ml luego del procedimiento, el mismo que fue diluido para obtener tres concentraciones al 25%, 50% y 100%, se utilizó Clorhexidina al 0,12%, Ampicilina de 10ug como control positivo y agua como control negativo, se realizó pruebas de hipótesis no paramétricas Kruskal Wallis y Mann Whitney. **Resultados:** La efectividad antibacteriana en la concentración al 25% obtuvo un halo promedio de 11,2 mm, al 50% la efectividad alcanzó una media de 9,6 mm y al 100% logró un promedio de 13,6 mm siendo esta concentración la más efectiva. Los controles positivos estuvieron en un rango de muy sensibles y sumamente sensibles y el control negativo no obtuvo efectividad. **Conclusiones:** Tanto la clorhexidina al 0,12 y la ampicilina de 10 ug, presentan una mejor actividad antimicrobiana que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo).

Palabras clave: *Minthostachys mollis* (Tipo); aceite esencial: *porphyromonas gingivalis*; efectividad antimicrobiana.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Abstract.

Objective: Determine the antibacterial activity of *Minthostachys mollis* (TIPO), a perennial ecuadorian bush in *Porphyromonas gingivalis*, one of the main periodontal pathogens. **Materials and methods:** In this experimental, prospective, transversal, in vitro study, an essential oil was made using a steam distillation technique, obtaining 10 ml that were diluted to obtain three different concentrations: 25%, 50% and 100%. 0.12% Chlorhexidine, 10 µg Ampicillin as positive control and water as negative control were used. Kruskal Wallis and Mann Whitney hypothesis tests were performed. **Results:** The antibacterial effectiveness at a 25% concentration obtained an average halo of 11.2 mm; at 50%, 9.6 mm; and at 100% , 13.6 mm, the most effective. Positive control varied from very sensitive to highly sensitive; negative control was not effective. **Conclusions:** Both, chlorhexidine at 0.12 and 10ug ampicillin have better antimicrobial activity than the *Minthostachys mollis* essential oil.

Key Words: *Minthostachys mollis*; essential oil; *porphyromonas gingivalis*; antimicrobial effect.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Resumo.

Objetivo: Determinar a atividade antibacteriana da *Minthostachys mollis* (Tipo) um arbusto perene da serrania equatoriana contra à *Porphyromonas gingivalis* que é um dos principais periodontopatógenos. **Materiais e métodos:** No presente estudo experimental, prospectivo, transversal in-vitro elaborou-se um óleo essencial utilizando a técnica de destilação por arraste de vapor de água, obtendo 10 ml após o procedimento, mesmo que foi diluído para obter concentrações de 25%, 50% e 100%, utilizou-se clorhexidina 0,12%, Ampicilina de 10ug como controle positivo e água como controle negativo, se realizaram testes de hipóteses não paramétricas Kruskall Wallis e Mann Whitney. **Resultados:** A efetividade antibacteriana na concentração de 25% obteve uma média no halo de inibição de 11,2mm, em aquele de 50% a efetividade alcançou uma média de 9,6mm e em aquele de 100% alcançou uma média de 13,6mm, sendo esta ultima a concentração mais efetiva. Os controles positivos estiveram num rango entre muito sensíveis e altamente sensíveis, e o controle negativo não obteve efetividade. **Conclusões:** A clorhexidina 0,12% e Ampicilina 10ug apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana que o óleo essencial de *Minthostachys mollis* (Tipo)

Palavras chave: *Minthostachys mollis* (Tipo); óleo essencial; *Porphyromonas gingivalis*; efetividade antimicrobiana.

Introducción

Vela E; 2011, menciona que toda zona anatómica del cuerpo humano está contaminada con una flora habitual normal, la cavidad bucal no es la excepción, se encuentra constituida por patógenos facultativos y por no patógenos por ejemplo, la placa supra gingival tiene $10^{10} - 10^{12}$ bacterias por gramo y la saliva 10^8 bacterias por mililitro es decir que la cavidad bucal es una de las más contaminadas del organismo, muchos son los fármacos que se encaminan a la disminución de la carga microbiana tanto en salud como en enfermedad, pero existen alternativas con un similar grado de eficacia y sin efectos adversos, estamos hablando de los aceites esenciales. (1)

El correcto conocimiento, manejo y utilización de las plantas medicinales nos permite su empleo con fines curativos, por lo que hay que rescatar que hoy en día más personas están interesadas en el uso de la fitoterapia como alternativa para los productos obtenidos a través de la fabricación química y buscan opciones únicamente naturales. (2,3)

Las plantas medicinales con todo el peso histórico y sus beneficios son capaces de generar esencias en cantidades apreciables y sus componentes, solos o en combinación, exhiben una o varias actividades biológicas como por ejemplo, antibacteriana, antiviral, anti fúngica, cabe mencionar que todos los aceites esenciales producen un efecto antiséptico. (4) Las plantas y todos sus beneficios activos han sido utilizados por la humanidad desde siempre, numerosos son los estudios que muestran las innumerables cualidades que estas poseen y sus diversas aplicaciones. (5,6,7,8,9)

La presente investigación se realizará en base a evaluar si el aceite esencial del *Minthostachys mollis* (Tipo) al 25, 50 y 100% posee efectividad antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis*.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Materiales y métodos.

En el presente estudio de tipo experimental, prospectivo, transversa, in vitro.

Extracción del aceite esencial.

Para desarrollar esta investigación comenzamos con la recolección de la planta (**Foto N°1**) que se la realizó en Pifo que es una parroquia del Distrito Metropolitano de Quito, al Nororiente de la Capital que se encuentra a 2770 m brindando un ambiente propicio para la proliferación en abundancia de esta planta perteneciente a la familia Lamiaceae, se recolecto aproximadamente 4 kg de este arbusto perenne en su totalidad, las cuales fueron desinfectadas con alcohol antiséptico de 72 G.L para luego ser cortadas y seleccionamos las hojas, flores y talluelos más aptos, obteniendo como resultado 600 gramos de materia prima, se las envolvió en papel para ser trasladadas a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador para su posterior procesamiento.



Foto N°1.- Planta a recolectar *Minthostachys mollis* (tipo)

El proceso de extracción se lo llevo a cabo por el B.F. Darwin Roldan Robles del Laboratorio de Química Farmacéutica de la U.C.E. La muestra se la sometió al proceso de

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

extracción conocido como destilación por arrastre con vapor de agua, teniendo en cuenta que la planta en estudio en la prueba piloto obtuvo un promedio del 1% de rendimiento. El proceso 4 en si consiste en desprender los componentes insolubles en el agua y ligeramente volátiles, de los productos no volátiles; de esta forma los compuestos orgánicos con un alto punto de ebullición son destilados con rapidez por debajo del punto de ebullición del agua, al lograr ser arrastrados por el vapor producido.

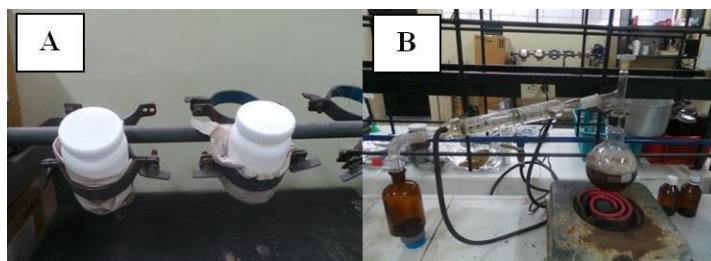


Foto N°2.- A) Agitación continua de la planta con agua; B) Destilación por arrastre de vapor de agua

Después del primer proceso se obtuvo un compuesto orgánico que es el aceite esencial y un compuesto líquido que es el agua, para separar el agua se lo sometió a un segundo paso que es la división líquido a líquido en un embudo de separación, se le añadió un solvente el HEXANO que es un líquido incoloro que dentro de sus propiedades esta ser afín a los compuestos orgánicos, dando como resultado el aceite esencial más el Hexano y más el agua, se descarta el agua y nos quedan los otros dos compuesto.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

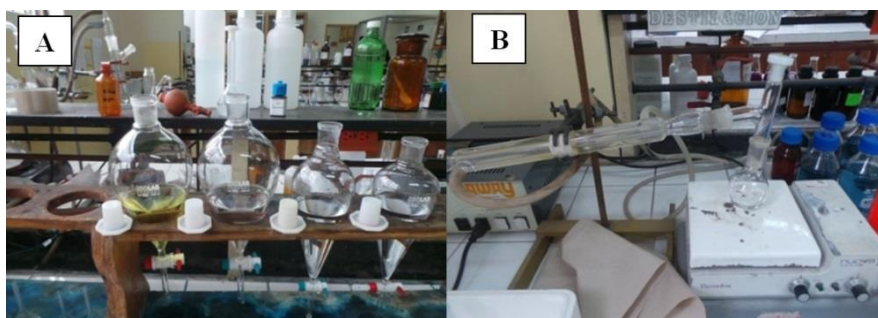


Foto N° 3.- Embudos de separación con solvente (hexano); B) Destilación, evaporación el hexano

Para obtener el aceite esencial destilamos mediante calor el Hexano que es muy volátil y obtuvimos 10 ml de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo), seguidamente se procedió a la dilución del mismo en el cual 2 ml fueron utilizados en una proporción de 1:4 para hacer una dilución al 25%, 2 ml para una dilución al 50% en una relación 1:2 y los 6 ml restantes se los mantuvo puros. Para realizar las diluciones se utilizó Aceite mineral estabilizado.



Foto N° 4.- Aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) a sus diferentes concentraciones.

Preparación del inóculo bacteriano.

El estudio se lo realizó con una cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, este acrónimo nos indica que es un material biológico de referencia certificado. La cual se la reactivo para ser una cepa viable.

El inóculo se preparó recolectando con un aza a la *Porphyromonas gingivalis*, se la diluyó en agua destilada y se utilizó un estándar de turbidez de McFarland 22 que usa como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según la escala que va de 0.5 a 10, tenemos que agitarla constantemente para luego compararla de una manera visual con esta concentración.

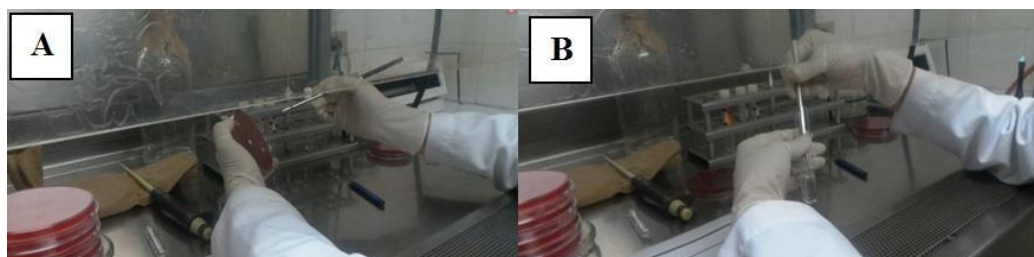


Foto N° 5.- A) Recolección de *Porphyromonas gingivalis* para la preparación del inóculo bacteriano; B) Dilución en agua destilada de *Porphyromonas gingivalis* para la preparación del inóculo bacteriano

Una vez obtenido el inóculo bacteriano proseguimos con la preparación de los discos de papel colocamos la cantidad justa de antimicrobiano, puesto que una sobre carga falsearía los resultados, en este caso vamos a utilizar una micropipeta con la cual se colocó 20 μ L (microlitros) de *Minthostachys mollis* (Tipo) en sus diferentes concentraciones en cada disco de papel.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

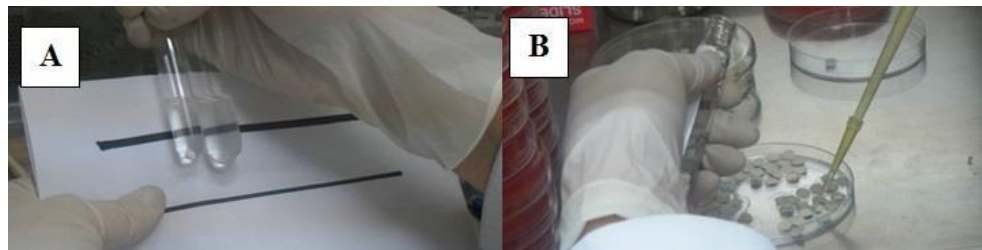


Foto N° 6.- A) Comparación del inoculo bacteriano de manera visual con la solución MCFarland; B) Colocación del antimicrobiano en los discos de papel

Siembra en el agar sangre.

El agar sangre es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento de cuantiosos microorganismos, al ser suplementado con sangre ovina, favorece al desarrollo de microorganismos nutricionalmente exigentes. La infusión de musculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, (10) El agregado de 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (Britas-heep) promueve el crecimiento de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Una vez que tenemos la caja Petri con el agar sangre, realizamos un hisopado con el inoculo bacteriano, que consiste en tomar la caja y hacer estrías en la superficie del agar en tres direcciones y alrededor, lo que nos permite que la bacteria crezca en toda la extensión de la caja, realizado esto dejamos secar las placas por 5 minutos y luego con una pinza estéril se colocan los discos de papel filtro impregnado con 20 μ L del aceite esencial a las diferentes concentraciones, utilizamos un control negativo que fue el agua y dos controles positivos la Clorhexidina al 0,12% y la Ampicilina de 10ug.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

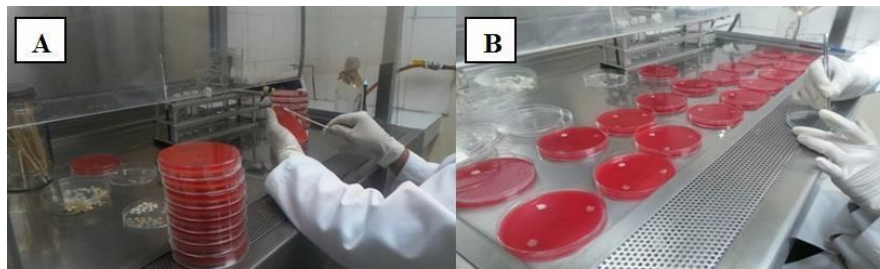


Foto N° 7.- A) Hisopado del inóculo bacteriano en todas las cajas Petri; B) Colocación de los discos de papel embebidos con el aceite esencial

Se deja reposar las placas por 15 minutos a temperatura ambiente para que el disco absorba agua del medio de cultivo y así permita la difusión radial del antimicrobiano para luego trasladar a una jarra de incubación de anaerobios por 48 horas y a 37 grados centígrados. Después de dos días se procedió a la lectura de las medidas de los halos de inhibición.

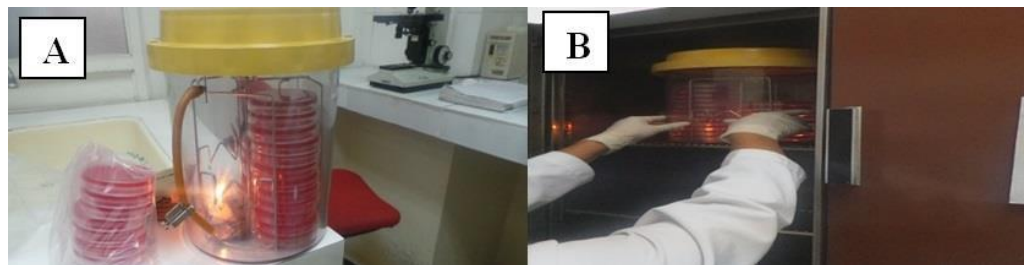


Foto N° 8.- A) Se coloca en la jarra una vela para consumir el oxígeno dentro de esta y que se vuelva un medio anaerobio; B) Colocación de la jarra de incubación de anaerobios en la incubadora a 37 grados centígrados

Resultados.

Inicialmente se verifica que las muestras tomadas provienen de una población con distribución Normal, esto se realiza con las pruebas de Kolmogorov - Smirnov o con la prueba de

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Shapiro - Wilk (menor a 20 datos). Los resultados obtenidos se los midió de una manera cuantitativa utilizando el promedio de los halos de inhibición y de forma cualitativa basándonos en la escala de Duraffourd.

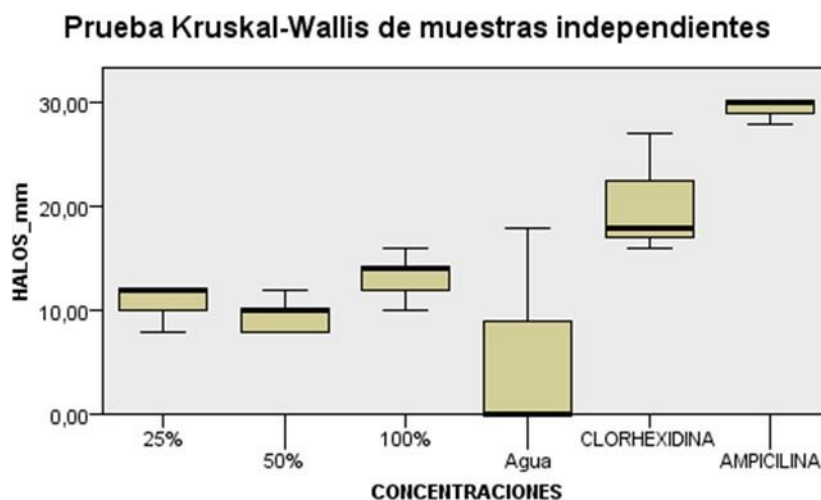


Figura N° 1.- Muestra los halos de inhibición promedio

Utilizando un calibrador para método de ensayo de la susceptibilidad de Kirby Bauer se procedió a la medición de cada uno de los halos de inhibición de todas las cajas de Petri. Siendo para una concentración al 25% un halo promedio de 11,2 mm, al 50% la efectividad alcanzó un halo de 9,6 mm de promedio y al 100% logró una media de 13,6 mm siendo esta concentración la más efectiva. La Clorhexidina al 0,12% obtuvo 17,3 mm y la Ampicilina de 10 ug con 29,3 mm en promedio.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

| HALO DE INHIBICION | | | | | |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|--------------|
| SUSTANCIA A APLICAR | NULA (-) | SENSIBLE (+) | MUY SENSIBLE (++) | SUMAMENTE SENSIBLE (+++) | TOTAL |
| ACEITE ESENCIAL DE TIPO AL 25% | 0 (0%) | 18 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 18 |
| ACEITE ESENCIAL DE TIPO AL 50% | 0 (0%) | 18 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 18 |
| ACEITE ESENCIAL DE TIPO AL 100% | 0 (0%) | 6 (33,33) | 12 (66,66) | 0 (0%) | 18 |
| CONTROL NEGATIVO AGUA | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 |
| CONTROL POSITIVO CLORHEXIDINA 0,12 | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (0) | 0 (0%) | 3 |
| AMPICILINA 10 ug | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 | 3 |
| TOTAL | 0 | 42 | 15 | 3 | 60 |

Tabla N° 1.- Muestra la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo) en sus diferentes concentraciones, encasillándose dentro de una escala sensible y muy sensible

Para realizar la medición de manera cualitativa nos basamos en las tablas de actividad antimicrobiana sustentada en porcentajes, la cual establece el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y lo encasilla dentro de los parámetros determinados como las pautas de Duraffourd, (11) que nos indica:

Para un diámetro inferior a 8 mm, se le otorga la característica de Nula (-).

Para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm, se lo define como (sensible = +).

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Un diámetro entre 14 y 20 mm, se lo encasilla como Medio (muy sensible =++).

Finalmente para un diámetro superior a 20 mm es sumamente sensible (+++).

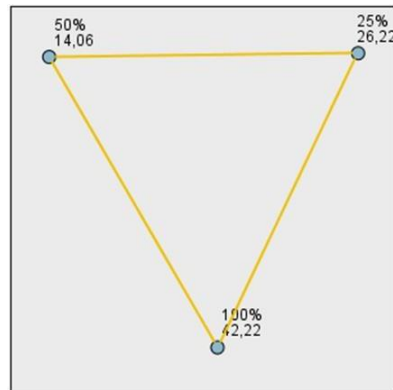


Figura N° 2.- Comparaciones por parejas de concentraciones

La prueba dos a dos se observa que ninguna es similar a las otras dos.

El valor más alto es la concentración al 100%, le sigue la concentración al 25% y por último la concentración al 50%.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

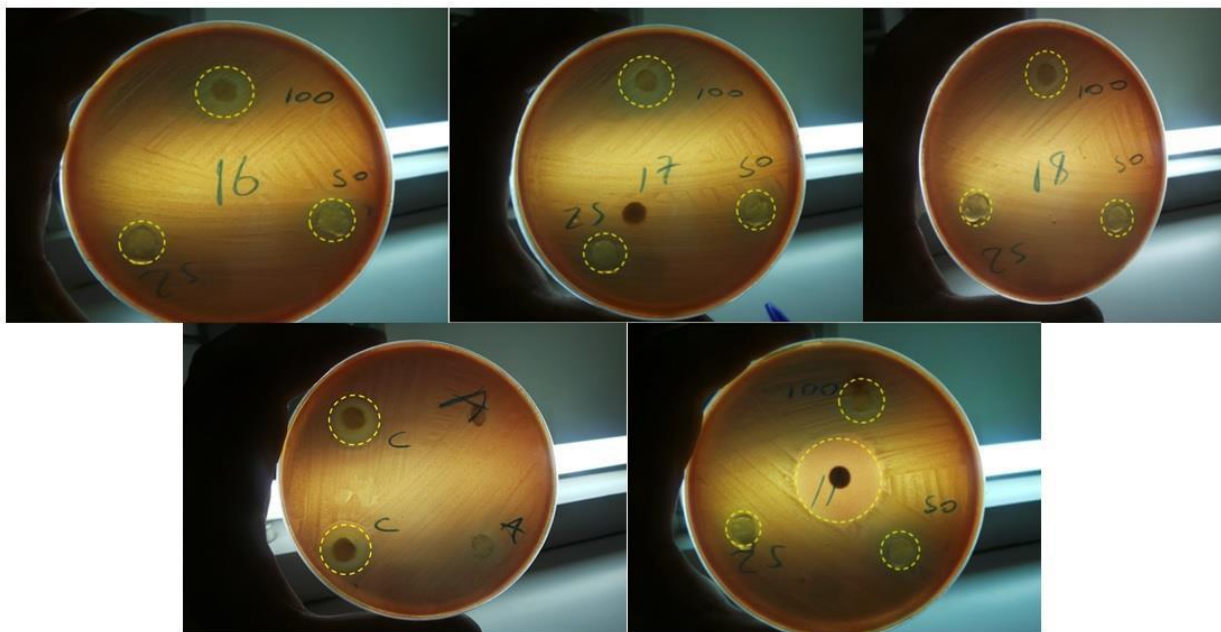


Foto N° 9.- Halos de Inhibición

Podemos observar los distintos halos de inhibición del aceite esencial, los mejores resultados cualitativos se observaron con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Tipo) al 100% o aceite puro, encasillándose en un rango de sensible y muy sensible, seguido por la concentración al 25% y al final la concentración al 50% que se encuentran en la condición de sensibles. Mientras que la Clorhexidina al 0,12% se delimito en una categoría de muy sensible y la Ampicilina de 10 ug se mantuvo en una índole de sumamente sensible.

Discusión.

Varias son las pesquisas que evalúan la actividad antimicrobiana que poseen los aceites esenciales en un estudio observó un alto efecto antimicótico frente a cepas de *Cándida albicans* en las concentraciones al 50 y 100%, en nuestra investigación se obtuvo mayor eficacia con la concentración al 25 y 100%. (12)

Aranza IL; 2010, (5) consiguió resultados satisfactorios los mismos que se comparten con este estudio, puesto que la actividad antibacteriana fue mayor en una concentración al 100% o aceite puro, que en sus otras concentraciones.

Cruzado-Donato JL; 2012, logro resultados exitosos al hallar la Concentración Inhibitoria Mínima, después del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) trabajando sobre *Streptococcus mutans*, se concluyó que es en una dilución al 50%, sabiendo que la CIM es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación, (8) en el estudio realizado la concentración más baja que se utilizó fue al 25% obteniendo resultados favorables.

Huari-Guerrero GM; 2014, (11) Demuestra que tiene un mayor efecto inhibitorio el aceite al 100% sobre la bacteria con un halo promedio de 10.79 mm, comparado con las diluciones al 50 % y 25 %, concordando con esta investigación ya que el aceite al 100% también obtuvo una mejor actividad con un halo promedio de 13,6 mm, seguida por la concentración al 25% con un halo de 11,2 mm y el aceite al 50% con un halo promedio de 9,6 mm.

La actividad antimicrobiana, antifúngica e inclusive antiviral de la *Minthostachys mollis* (Tipo), son propiedades apreciables debido a que los aceites esenciales pueden actuar como desacopladores, (12) los cuales interfieren en la translocación de los protones sobre la membrana y consecuentemente interrumpir la fosforilación del ADP.

En todo el callejón interandino que incluye a Perú, Argentina, Ecuador se puede encontrar una gran variedad de plantas que presentan amplias cualidades que sabiéndolas aprovechar, (13)

como elementos básicos, nos dan una gama de productos medicinales, que pueden ser utilizados por la población como una alternativa a los tratamientos convencionales.

En relación a los resultados podemos decir que la efectividad del aceite está mediada por la calidad de la planta, la época y el lugar de recolección, el manejo de la misma y el proceso de extracción. El presente trabajo investigativo tuvo como fin demostrar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) en sus diferentes concentraciones 25, 50 y 100 % frente a la *Porphyromonas gingivalis*, sabiendo que esta es una de las bacterias más comunes dentro de las periodontopatías y está en segundo lugar de las patologías orales solo después de la caries. Se demostró la riqueza que existe en la flora ecuatoriana y sus innumerables formas de aprovecharla, obteniendo resultados positivos.

Conclusiones.

Según los resultados obtenidos en la presente investigación es viable concluir que:

Los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana independientemente de sus concentraciones.

La concentración que posee una mejor efectividad antimicrobiana es la concentración al 100% o aceite puro de *Minthostachys mollis* (Tipo) con un halo promedio de 13,6 mm.

Se determinó que de manera cualitativa la efectividad antimicrobiana del aceite esencial se la puede encasillar dentro de un parámetro de sensible y muy sensible.

Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 %
Porphyromonas gingivalis

Bibliografía.

1. Vela E. Microbiología Estomatológica Quito: Universidad Central del Ecuador; 2011.
2. CEP. Manual plantas medicinales: formación para el empleo. 1st ed. Madrid: autor; 2010.
3. Waizel-Bucay J. Las plantas medicinales y las ciencias: una visión multidisciplinaria México: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
4. Stashenko EE. Aceites Esenciales Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2009.
5. Azaña-Espinoza IL. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2010.
6. Carlos 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 Publica. 2008; 25(3): p. 298-301.
7. Díaz-Ledesma K. Determinación de la actividad antibacteriana "invitro" de *Minthostachys mollis* griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista. Lima: Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor San Marcos; 2005.
8. Cruzado-Donato J. Concentración inhibitoria mínima "in vitro" del *Minthostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Tesis para optar el grado de bachiller en Estomatología. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Medicina; 2012.
9. Grace-Medalth H. Efecto Antibacteriano In vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en *Streptococcus mutans*. Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor San Marcos, Facultad de Odontología; 2014.
10. Britania S.A. Sangre Agar Base. Buenos Aires:, Laboratorios Britania; 2010.
11. Huari-Guerrero G. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *minthostachys mollis* (muña) en *streptococcus mutans*. Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2014.
12. 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): p. 298-301.
13. Desmarchelier-C A. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de salud Buenos Aires: Corpuz Editorial y Distribuidora; 2015.