

ACTIVIDAD PROMISORIA DE ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES PERTENECIENTES A LA TRIBU PIPEREAE FRENTE A *Artemia salina* Y *Xanthomonas albilineans*

Yáima Sánchez, Oriela Pino, Fanny Jorge Lazo, Yudith Abreu, E. Naranjo, Aleika Iglesia

Departamento de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana. Cuba. Correo electrónico: ysanchez@censa.edu.cu

RESUMEN: Los géneros *Piper* y *Lepianthes* han sido empleados como fuente de insecticidas y en la medicina natural. Son conocidas las propiedades antifúngica, insecticida, antialimentaria, estimulante, bactericida y citotóxica de muchos de sus extractos. El objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades de tres aceites esenciales de especies de estos géneros como candidatos para el desarrollo de productos con actividad plaguicida y antitumoral. Los aceites esenciales de *P. auritum* (CA1), *P. aduncum* subsp. *ossanum* (PAO1) y *L. umbellata* (LU1) fueron obtenidos por hidrodestilación empleando un equipo Clevenger y se evaluaron frente a *Artemia salina*, organismo indicador de actividad plaguicida y antitumoral. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales frente a *Xanthomonas albilineans* (los serovares I y III) se evaluó empleando los métodos de difusión en agar y envenenamiento del medio. La evaluación de la actividad plaguicida y antitumoral de los aceites esenciales evidenció un 100% de mortalidad de las artemias, a las 24 horas a las concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/mL ($LC_{50} < 100$ µg/mL; $LC_{50} < 125$ µg/mL; $LC_{50} < 250$ µg/mL) para CA1, LU1 y PAO1 respectivamente. Al evaluar la acción antimicrobiana de los aceites esenciales PAO1 y CA1 se observó una inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración mínima inhibitoria (CMI) menor de 1,25 µL/mL frente al serovar I y una concentración mínima inhibitoria de 0,5 y 1 µL/mL de CA1 y PAO1 respectivamente, frente al serovar III. CA1, LU1 y PAO1 son candidatos botánicos con actividad plaguicida y antitumoral promisorias.

(Palabras clave: aceite esencial; *Piper*; *Lepianthes*; *Artemia salina*; *Xanthomonas albilineans*)

PROMISORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM SPECIES BELONGING TO PIPEREAE TRIBU AGAINST *Artemia salina* AND *Xanthomonas albilineans*

ABSTRACT: The genera *Piper* and *Lepianthes* have been used as a source of insecticides and natural medicines. The antifungal, insecticide, antifeeding, stimulant, bactericidal and cytotoxic properties of many of their extracts are known. The aim of this study was to establish the potential of essential oils from three species of these genera as candidates for the development of products with pesticide and antitumoral activity. The essential oils from *P. auritum* (CA1), *P. aduncum* subsp. *ossanum* (PAO1) and *L. umbellata* (LU1) were obtained by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and they were studied for their antitumoral activity by the brine shrimp lethality bioassay. The essential oils were tested against *Xanthomonas albilineans* (serovars I and III) for antibacterial properties using agar diffusion and poisoning medium methods. The essential oils showed 100 % of mortality of *Artemia* at 24 hours at concentrations of 250, 500 y 1000 µg/mL ($LD_{50} < 100$ µg/mL; $LD_{50} < 125$ µg/mL; $LD_{50} < 250$ µg/mL) for CA1, LU1 and PAO1 respectively. The bioassay for antimicrobial activity showed that the essential oils PAO1 and CA1 had a strong bactericidal activity. An inhibition of bacterial growth was at a minimum inhibitory concentration (MIC) less than 1,25 mL / mL against serovar I and a minimum inhibitory concentration of 0,5 and 1 mL / mL of CA1 and PAO1, respectively, against serovar III observed. CA1, LU1 and PAO1 are botanical candidates with pesticide and antitumoral potential.

(Key words: essential oil; *Piper*; *Lepianthes*; *Artemia salina*; *Xanthomonas albilineans*)

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen la mayor fuente de productos orgánicos que se conoce, entre los cuales se distinguen alcaloides, flavonoides, glicósidos, fitoesteres, terpenos, carotenoides y aceites esenciales. Todos estos compuestos tienen una utilidad potencial, ya sea como aditivos de alimentos, fármacos y/o plaguicidas de origen natural, estos últimos son de gran aceptación en el mercado por ser de probada eficacia y prácticamente inocuos al medio ambiente (1,2).

Los aceites esenciales son empleados como aromatizantes y/o saborizantes y como ingredientes de algunos preparados farmacéuticos, son la base de perfumes y productos cosméticos, desodorantes, lociones, jabones líquidos y pastas dentífricas (3,4). Algunos poseen propiedades antifúngicas y antibacterianas frente a microorganismos patógenos, son tóxicos a nematodos, un amplio espectro de insectos plagas y parecen ser particularmente efectivos contra plagas de productos almacenados (3,5). Además de sus efectos tóxicos agudos, producen numerosos efectos subletales, actúan como inhibidores del crecimiento larval, antialimentarios y repelentes para un amplio rango de insectos y ácaros (6,7).

Existen excelentes oportunidades para el desarrollo de plaguicidas basados en aceites esenciales; su eficacia, baja toxicidad y su disponibilidad general son características claves para llegar a un producto potencialmente comercializable. Aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la tribu Pipereae, familia Piperaceae, inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en el hombre, plantas y animales (8). Sin embargo, los aceites esenciales constituyen una alternativa poco explorada en nuestro país como fuente de plaguicidas y su futura aplicación requiere del desarrollo de investigaciones básicas sobre la química y la biología de estos compuestos que permitan establecer las potencialidades de diferentes aceites para el desarrollo futuro de productos fitosanitarios.

El objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades de los aceites esenciales de *Piper auritum* Kunth, *Piper aduncum* subsp. *ossanum* (C. DC.) Saralegui y *Lepianthes umbellata* (L.) Raf. como candidatos para el desarrollo de productos con actividad plaguicida y antitumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los aceites esenciales:

Las hojas de *P. auritum*, *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *L. umbellata* se recolectaron en San José de las Lajas, provincia La Habana. Se partió del material vegetal fresco, no dañado y la extracción se realizó por el método de hidrodestilación, empleando un equipo Clevenger, según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (9). El tiempo de destilación fue de 3 horas. Los aceites esenciales obtenidos a partir de *P. auritum*, *P. aduncum* subsp. *ossanum* y *L. umbellata* se denominaron **CA1**, **PAO1** y **LU1** respectivamente, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se guardaron en frío hasta su evaluación biológica.

Ensayo de evaluación de la actividad frente a *Artemia salina* Leach:

El ensayo frente a *A. salina*, indicador de actividad plaguicida y antitumoral, se realizó según lo descrito por Meyer *et al.* (10). Se utilizaron placas plásticas de 96 pocillos; a cada uno de ellos se le adicionó sucesivamente 200 µL de agua de mar (conteniendo 5-10 larvas de *A. salina*) y una solución (50 µL) de la muestra disuelta en una mezcla de acetona:Tween 20:Solución de Sal de mar.

Los aceites esenciales fueron evaluados a las concentraciones finales de 1000, 500, 250, 100, 50 y 10 µg/mL y aquellos con valores de $LC_{50} < 1000$ µg/mL fueron considerados activos (10). Un total de 8 pozos (repeticiones) fueron utilizados para cada concentración. La mortalidad de las larvas se evaluó a las 6 y 24 horas. La muerte se estableció por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el esteriomicroscopio (11,12). Se utilizaron dos controles negativos: uno con el agua de mar y otro con la mezcla acetona-Tween 20-agua utilizada para evaluar las muestras. La prueba se consideró válida si el porcentaje de mortalidad en el control no excedió el 10% (11). Como plaguicida de referencia se utilizó la rotenona (control positivo).

Ensayo de evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson:

Se utilizaron los serovares I y III de la bacteria fitopatogena *X. albilineans*, pertenecientes al cepario de bacterias del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del CENSA, aislados de muestras procedentes de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de

Azúcar de Jovellanos, e identificados mediante métodos moleculares (13). La bacteria se sembró en medio Wilbrink (BDH) y se incubó a 28°C durante 48 horas. Una vez activada, se prepararon suspensiones bacterianas hasta lograr una turbidez comparable al patrón 0,5 en la escala de Mc Farland. Esta comparación se realizó visualmente y mediante lecturas en el espectrofotómetro, a longitud de onda de 625 nm, se ajustó en el rango de 0,08 a 0,1 que equivale a 1-2 x 10⁸ UFC/mL⁻¹. De este inóculo se tomaron alícuotas y se colocaron en placas Petri estériles con 20 mL del medio de cultivo.

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos a los aceites esenciales se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (14), basada en el método de Kirby-Bauer. Un volumen de 15 µL de cada aceite puro se dejó secar sobre pequeños discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, que posteriormente se centraron cuidadosamente sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas. La bacteria se incubó durante 48 horas a una temperatura de 28°C. Una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano. La actividad de los aceites se clasificó en marcada, moderada, ligera o sin actividad, según los rangos de la escala utilizada por Toda *et al.* (15).

Posterior a este experimento se realizó el envenenamiento del medio o diluciones seriadas en medio sólido; se utilizaron dosis de 5; 2,5 y 1,25 µL/mL frente al serovar I y dosis de 4; 2; 1; 0,5 y 0,25 µL/mL frente al serovar III de los aceites esenciales activos en el experimento anterior. Los aceites se añaden en placas Petri cuando el medio aún está líquido. Las placas se inocularon con la bacteria una vez que este se solidificó y los resultados se expresan como la concentración mínima inhibitoria (CMI) (16). Las condiciones del cultivo e incubación coincidieron con las del experimento anterior. En ambos casos la evaluación se realizó por triplicado y se empleó un control del crecimiento bacteriano y un control positivo de Cloranfenicol (30 µg/disco⁻¹) (Imefa).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la actividad de los aceites esenciales frente a *Artemia salina* evidenció un 100% de mortalidad de las artemias, a las 24 horas, a una concentración de 250, 500 y 1000 µg/mL (LC₅₀ < 100 µg/mL; LC₅₀ < 125 µg/mL; LC₅₀ < 250 µg/mL) para **CA1**, **LU1** y **PAO1** respectivamente. El efecto tóxico agudo de estos aceites se observó a las seis horas de evaluación.

El ensayo de evaluación de la actividad frente a *A. salina* se usa para la pre-evaluación de extractos vegetales en el descubrimiento de compuestos antitumorales (17). Es útil además, para predecir actividades plaguicidas y responde a un amplio rango de compuestos química y biológicamente diversos; es por ello que resulta tan importante su uso en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas de origen natural (18). Tiene las ventajas de ser rápido, barato y sencillo. Se pueden utilizar fácilmente un gran número de organismos para la validación estadística, no necesita equipamiento especial y se emplean pequeñas cantidades de muestras. Además, los defensores de los derechos de los animales no han objetado el uso de estos invertebrados para el trabajo experimental (18).

Estos aceites esenciales, fundamentalmente el de *P. auritum* que mostró una mayor actividad frente a artemia, pueden ser objeto de estudios más profundos empleando bioensayos más específicos para determinar su actividad antitumoral y plaguicida pues demostraron ser promisorios en este sentido; más aún si se tiene en cuenta que existe información sobre diferentes extractos de las especies evaluadas, relacionada con estas actividades. Por ejemplo, extractos acuosos y metanólicos de *P. aduncum*, *P. hostmannianum* y *P. tuberculatum* se evaluaron empleando el bioensayo de artemia y mostraron una LC₅₀ menor de 50 µg/mL (19). El aceite esencial de la parte aérea de *P. aduncum*, obtenido mediante destilación por arrastre con vapor, se evaluó frente al mismo organismo y mostró una LC₅₀ de 41,3 µg/mL (20). Las diferencias en la actividad biológica pueden estar asociadas a diferencias en la sensibilidad del organismo empleado y/o en la composición del aceite esencial. *P. aduncum* subsp. *ossanum* se describió por Saralegui (21) como una especie endémica de Cuba occidental y los resultados de actividad biológica de su aceite esencial frente a *A. salina* se informan por primera vez en este trabajo.

Por otra parte, el extracto diclorometánico de las hojas de *L. umbellata* y tres de sus fracciones resultaron muy potentes en la inhibición de diferentes líneas celulares de cáncer humano a bajas concentraciones (menos de 10 µg/mL) (22).

Existen varios compuestos descritos en la literatura como sustancias citotóxicas frente a células tumorales, tal es el caso de β-cariofileno, β-elemeno, d-elemeno y α-humuleno (23,24,25,26,27). Tatman y Mo (28) verificaron que el linalol y α-pineno presentan actividad citotóxica frente a células de melanoma en ratones y de leucemia en humanos. Muchos de estos componentes están presentes en los aceites evaluados (29,30,31).

Además de su actividad antitumoral los aceites de la tribu Piperaceae están constituidos por fitoquímicos promisorios con actividad insecticida (32), alelopática (33,34) y antimicrobiana (35). Al respecto, numerosas especies han sido utilizadas en el control de diversos insectos y microorganismos responsables de la transmisión de enfermedades o como plagas en todos los cultivos del mundo.

La actividad detectada a través del ensayo de *Artemia* puede ser usada además como un indicador conveniente de la toxicidad frente a microorganismos (36). La evaluación de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales **CA1**, **PA01** y **LU1** sobre los serovares I y III se observa en la Tabla 1.

TABLA 1. Efecto de los aceites esenciales sobre el crecimiento de *Xanthomonas albilineans* (Serovar I y III)./ *Effects of the essential oils on Xanthomonas albilineans (Serovar I and III) growth*

Tratamiento	Halo de inhibición promedio (mm)	
	Serovar I	Serovar III
<i>P. auritum</i> (15 µL) (CA1)	IT	IT
<i>P. aduncum</i> subsp. <i>ossanum</i> (15 µL) (PA01)	22	36
<i>L. umbellata</i> (15 µL) (LU1)	NI	NI
Cloranfenicol (30 µg)	45	50

IT: Inhibición Total

NI: No Inhibición

Al evaluar el aceite **CA1** se observó una inhibición total del crecimiento bacteriano, y no la formación de halos de inhibición alrededor del disco, en el caso de **PA01** la inhibición fue marcada, siendo el serovar III el más sensible (Fig. 1). Sin embargo, en el caso del aceite **LU1**, no se observó inhibición del crecimiento bacteriano.

PA01 y **CA1** fueron los aceites que mostraron actividad en el experimento de difusión en agar por lo que se realizó un análisis más profundo donde se estimó la concentración mínima inhibitoria (menor concentración del aceite capaz de inhibir el crecimiento bacteriano) mediante el método de envenenamiento del medio. En este estudio, se observó la inhibición total del crecimiento del serovar I de la bacteria analizada en todas las dosis evaluadas, CMI < 1,25 µL/mL. En el caso del serovar III, la CMI fue de 0,5 µL/mL y 1,0 µL/mL para **CA1** y **PA01**, respectivamente.

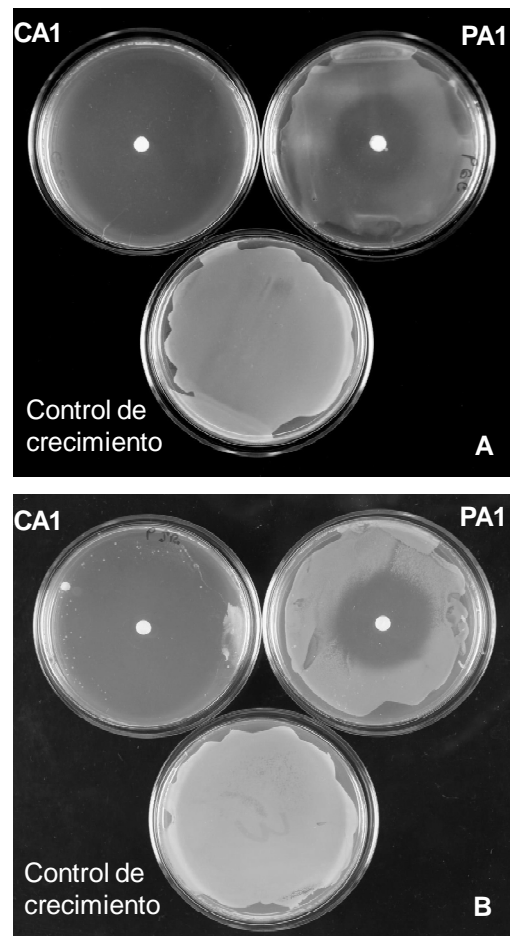


FIGURA 1. Inhibición del crecimiento de *Xanthomonas albilineans* a) serovar I y b) serovar III./ *Growth inhibition of Xanthomonas albilineans a) serovar I and b) serovar III.*

El género *Piper* es bien conocido como fuente de compuestos biológicamente activos como monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, isobutilamidas y con frecuencia alcaloides del grupo de las piridinas, alcaloides aporfínicos del grupo de las isoquinolinas y aminas alcaloidales (21). Varios metabolitos aislados de especies pertenecientes al género poseen utilidad potencial como antimicóticos, insecticidas, antialimentarios, estimulantes, bactericidas y citotóxicos. Sus aceites esenciales inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos patógenos al hombre, plantas y animales, siendo particularmente útiles como antivirales, antifúngicos y antibacterianos (8).

La actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe, en gran medida, a la presencia de terpenoides (37,38). Así mismo, algunos autores plantean que los aceites con un alto porcentaje de

compuestos terpenoides del tipo fenólicos poseen notables propiedades antimicrobianas (39,40,41).

Se demostró la actividad frente a microorganismos de compuestos terpenoides, tales como el timol, carvacrol, linalool, eugenol, safrol, α -pinene y β -pinene (37,42). Compuestos de este tipo se identificaron como componentes de los aceites esenciales estudiados (30,31). En una publicación realizada anteriormente se informó la composición química y actividad biológica del aceite esencial de *P. auritum* (caisimón de anís) frente a la bacteria estudiada y la acción bactericida y/o bacteriostática del aceite esencial se atribuye a sus componentes terpenoides, fundamentalmente a los oxigenados y la mayor contribución a este efecto puede deberse al safrol, componente mayoritario del aceite (29).

Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintos orgánulos de la célula (43). El mecanismo de acción de estos compuestos aún hoy no ha sido claramente caracterizado. Algunos autores plantean que su actividad bacteriostática y/o bactericida se debe, fundamentalmente, a la sobrecarga a la que es sometida la membrana celular de los microorganismos de forma tal que la hace perder el control y la integridad (4,42).

Estos resultados son de gran importancia, no solo desde el punto de vista cognoscitivo, sino también práctico, pues *X. albilineans* es la responsable de la escaldadura foliar, considerada la enfermedad bacteriana más importante de la caña y que provoca pérdidas millonarias en la producción cañera de Cuba y el mundo. La caña de azúcar es uno de los cultivos más extendidos a nivel mundial no solo por su uso en la producción de azúcar, sino además por servir como materia prima en la fabricación de papel, alcohol, maderas y enzimas industriales. Hasta este momento, las medidas fitosanitarias utilizadas para el control de la escaldadura de la hoja no resultan efectivas y esta enfermedad continúa causando pérdidas elevadas desde el punto de vista económico (44). El efecto biológico de **PAO1** y **CA1** sobre esta bacteria, establecido a nivel de laboratorio como resultado del presente trabajo, permite valorar las potencialidades de estos aceites como candidatos para el desarrollo de plaguicidas botánicos en el control fitosanitario de esta enfermedad bacteriana.

Estos resultados demuestran el enorme potencial de la tribu *Pipereae* y la familia *Piperaceae* como una fuente promisoría en el descubrimiento y desarrollo de

nuevos agentes antitumorales, antibacterianos y compuestos bioactivos novedosos. Nuevos plaguicidas, antibacterianos y antitumorales basados en estos aceites podrían constituir un punto de partida para el desarrollo futuro de productos comercialmente competitivos.

REFERENCIAS

- Ottaway PB. The roots of a health diet. *Chem Ind.* 2001; 22: 42-44.
- Ducrot PH. Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticide activity of natural products from higher plants. 2005: 47-58. En: Regnault RC, Philogene BJJ, Vincent C. (eds.). *Biopesticides of plant origin.* Lavoisier and Intercept, Ltd., Paris and Andover. 313.
- Gil EP, Sáez AV. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía cero emisiones. Universidad EAFIT. 2005. (Tesis).
- Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet). Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina. 2006. (Consultado. 9 oct 2008). Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>.
- Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol.* 2006; 51: 45-66.
- Castañeda ML, Muñoz A, Martínez JR, Stashenko E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Técnica.* 2007 Abr; XIII (033):165-166.
- Copping LG, Duke SO. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Manag Sci.* 2007; 63:524-554.
- Delgado AW, Cuca SLE. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. *Rev Productos Naturales.* 2007; 1(1):5-8.
- International Standardization Organization. ISO 6571. Spices, condiments and herbs- Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).

10. Meyer B N, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobse LB, Nichols DE, McLaughlin Jerry L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta médica*. 1982; 45: 31-4.
11. Vanhaecke P, Persoone G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. *Methodology and evaluation. Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*. 1984; 143-57.
12. Varó I, Serrano R, Navarro J C, López F J, Amat, F. Acute Lethal Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos to Different Species and Strains of *Artemia*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1998; 61:778-785.
13. Iglesia A, Días M, Álvarez E, Arocha Y. Diagnóstico de enfermedades bacterianas de la caña de azúcar en Cuba. En: *Actas del VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba*. 2008. Septiembre. (Conferencia).
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997; 17:234-238.
15. Toda M, Okubo S, Mara Y, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Jap J Bacteriol*. 1991; 46(5):845-849.
16. Hammer K A, Carson J F, Riley T V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999; 86: 985-990.
17. McLaughlin L, Rogers L L, Anderson J E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. 1998; 32: 513-524.
18. Mawardi R, Hazar B, Mohd I, Farediah A, Rahman M, Mohd A. Screening of tropical plants for the presence of bioactive compounds. *Pertanika*. 1992; 15(2):131-135.
19. Jacques ELQ, Massayoshi SN, Martin AP, Mascarenhas AA, da Silva ACP, Nicácia CP, et al. Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. *Pharmaceutical Biology*. 2004; 42 (3): 253-257.
20. Flores Q E, Velasco A P, Irahola S P, Gimenez T A. Aceites esenciales con actividad citotóxica como indicador de propiedades insecticidas. *BIOFARBO*. dic 1999; 7(7): 35-38.
21. Saralegui BH. Flora de la República de Cuba. Piperaceae. 2004; Fascículo 9(3):1-5.
22. Sacoman JL, Monteiro KM, Possenti A, Figueira GM, Foglio MA, Carvalho JE. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41(5): 411-5.
23. Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F, Legault J. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharmacol*. 2006; 103: 99-102.
24. Hou J, Sun T, Hu J, Chen S, Cai X, Zou G. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. *Food Chemistry*. 2006. Disponible en: <http://www.j.foodchem.2006.07.060>.
25. Tao L, Zhou L, Zheng L, Yao M. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chem. Pharmacol*. 2006; 58: 24-34.
26. Xiao J B, Chen X Q, Zhang Y W, Jiang X Y, Xu M. Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. *Brazilian J Med Biol Res*. 2006; 39: 731-8.
27. da Silva SL, Figueiredo PM, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. *Acta Amaz*. Jun 2007; 37 (2). Versión impresa ISSN 0044-5967. Disponible en: <http://www.scielo.php.htm>.
28. Tatman D, Mo. H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters*. 2002; 175: 129-39.
29. Sánchez Y, Pino O, Correa TMV, Naranjo E, Iglesia A. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (caisimón de años). *Rev Protección Veg*. 2009; (1): 39-46.

30. Leyva M, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, et al. Actividad larvica de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed*. 2009; 20: 5-13.
31. Martins AP, Salgueiro L, Vila R, Tomi F, Canigual S, Casanova J, et al. Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*. 1998; 49: 2019-23.
32. Scott I, Jensen HR, Philogene BJR, Arnason JT. A review of *Piper* spp. (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*. 2008;7(1):65-75.
33. Robayo D, Rodríguez Y. Determinación de la actividad alelopática de extractos de *Swinqlia glutinosa* Murray y *Piper aduncum* L., sobre germinación de semillas de arvenses. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá. 2006: 84pp.
34. Chávez DC, Pérez YJ. Efectos alelopáticos de extractos de *Piperaceae* sobre germinación y emergencia de arvenses y plantas cultivadas bajo condiciones controladas. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá. 2008: 96pp.
35. López A, Ming DS, Towers GHN. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. *J Nat Prod*. 2002; 65 (1): 62-64.
36. Serrano C, Ortega T, Villar A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* Bioassays: A revision. *Phytother Res*. 1996;10: 118-20.
37. Nanasombat S, Lohasupthawee P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonellae* and other enterobacteria. *Sci Tech J*. 2005; 5 (3): 527-538.
38. Mitia-Æulafia D, Vukovia-Gaëia B, Kneževia-Vukëevia J, Stankovia S, Simia D. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch Biol Sci. Belgrade*. 2005;57(3):173-178.
39. López LMT. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Fitoterapia*. 2006; 25(1):74-77.
40. Raybaudi-Massilia RM, Soliva RF, Martín OB. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. En: *Actas del I Simposio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados*, San Pedro, SP Brazil. 2006 Abril: 15-21.
41. Kotan R, Kordalic S, Cakird A. Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes. *Z. Naturforsch*. 2007; 62 c: 507-513.
42. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol*. 1994;76(6):626-631.
43. Fabio A, Cermelli C, Fabio G, Nicoletti P, Quaglio P. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res*. 2007; 21: 374-377.
44. Jiménez O, Contreras N. Nota técnica Respuesta de 11 variedades de caña de azúcar a la escaldadura foliar (*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson) y evaluación de dos métodos de inoculación. *Bioagro*. 2009 Agosto; 21(2).

(Recibido 1-2-2010; Aceptado 5-9-2010)