

EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper marginatum* JACQ. Y SUS COMPONENTES SOBRE *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DAWSON

Yaíma Sánchez*, Teresa M. Correa**, Yudith Abreu*, Oriela Pino*

* Departamento de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA),
Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Correo electrónico: ysanchez@censa.edu.cu; ** Laboratororio Anti-doping, Instituto de Medicina
Deportiva (IMD). Dirección Postal: 100 y Aldabó, Boyeros, La Habana, Cuba

RESUMEN: Los aceites esenciales constituyen un grupo de productos promisorios como plaguicidas; aunque en Cuba representan una alternativa poco explorada como fuente de productos fitosanitarios y su futura aplicación requiere de la ejecución de investigaciones básicas sobre la química y actividad biológica de estos compuestos. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer el efecto bacteriostático y/o bactericida del aceite de *Piper marginatum* Jacq. frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson e identificar los componentes responsables de este efecto. El aceite esencial de *P. marginatum* se obtuvo por hidrodestilación empleando un equipo Clevenger. Se determinó su rendimiento y su composición química se investigó por CG/EM. Se realizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de las diluciones seriadas frente a *X. albilineans*. Se identificaron los componentes responsables de la actividad biológica mediante el fraccionamiento del aceite esencial por cromatografía seca y las fracciones fueron identificadas por CG/EM, así como evaluadas frente a la bacteria antes mencionada. El aceite posee una fuerte actividad antibacteriana con CMI y CMB de 0,12 mg.mL⁻¹. Los componentes responsables de la actividad biológica observada son los compuestos oxigenados, fundamentalmente la mezcla de isosafrol y notosmirnol. Existen posibilidades de desarrollo del aceite esencial de *P. marginatum* como agente antibacteriano para el control de *X. albilineans*, considerando su actividad bactericida frente a esta importante bacteria.

(Palabras claves: aceite esencial; *Piper marginatum*; *Xanthomonas albilineans*; productos naturales)

EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF *Piper marginatum* JACQ. AND ITS COMPONENTS ON *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DAWSON

ABSTRACT: Essential oils are a group of promising products as pesticides. In Cuba, they have been little explored as an alternative source of plant protection products, and their future implementation requires of basic research on the chemical and biological activities of these compounds. Thus, the aim of this study was to establish the bacteriostatic and / or bactericidal effect of *Piper marginatum* Jacq. oil against *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson and identify the components responsible for this effect. The essential oil of *P. marginatum* was obtained by hydrodistillation in a Clevenger. Its yield was determined and its chemical composition was investigated by GC / MS. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *X. albilineans* were determined by the method of serial dilutions. The components responsible for the biological activity were identified by fractionating the essential oil by dry chromatography, and the fractions were tested against the above mentioned bacterium. This oil has a strong antibacterial activity with MIC and MBC of 0,12 mg / mL. The components responsible for the biological activity observed were the oxygenates, mainly a mixture of isosafrole and nothosmyrrol. The essential oil of *P. marginatum* showed potential to be developed as an antibacterial agent to control *X. albilineans*, considering its strong bactericidal activity against this important bacterium.

(Key words: essential oil; *Piper marginatum*; *Xanthomonas albilineans*; natural products)

INTRODUCCIÓN

La escaldadura foliar, provocada por la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson, es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de la caña de azúcar por sus efectos sobre los rendimientos agrícolas, la calidad de los jugos y las elevadas pérdidas que ocasiona en su fase aguda (1). La enfermedad también causa pérdidas indirectas debido a los costos de replantación de las zonas destruidas, la producción de material sano (vitroplantas y termoterapia) y la selección de variedades resistentes (2).

En estos momentos la escaldadura foliar es la enfermedad que mayores daños está produciendo en la caña de azúcar en nuestro país, debido a su amplia distribución, a la no existencia de variedades resistentes y porque las medidas fitosanitarias para su control son insuficientes. En la búsqueda de soluciones alternativas a muchos de los problemas fitosanitarios actuales, en los últimos años ha aumentado el uso de productos naturales, en particular los aceites esenciales, que representan un grupo de productos promisorios como plaguicidas (3).

En Cuba, los estudios sobre aceites esenciales se relacionan fundamentalmente con su empleo en las industrias alimentaria y cosmética y en menor extensión, con fines medicinales; aplicaciones relacionadas en muchos casos, con el conocimiento de su uso tradicional por la población para diversos fines. Se han llevado a cabo numerosos estudios de los componentes volátiles de algunas plantas cubanas, pero estos trabajos no abarcan la investigación de las actividades biológicas frente a plagas, ni de la relación composición química-actividad biológica (4,5).

Experimentos anteriores demostraron las potencialidades del aceite esencial de *Piper marginatum* J. para el control de *X. albilineans*, resultados que le permitieron ser seleccionado como promisorio en la etapa inicial de investigación. En este proceso de descubrimiento y desarrollo de aceites esenciales con fines prácticos, resulta crucial conocer como se relaciona la composición química de los aceites con el efecto biológico deseado, para enfrentar el gran reto que representa la estandarización de mezclas complejas de materiales vegetales y debido a la necesidad de contar con indicadores específicos para el control de la calidad en la obtención de productos eficaces y confiables. El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto antibacteriano del aceite de *P. marginatum* e identificar los componentes responsables de esta actividad frente a *X. albilineans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del aceite esencial

Las hojas de *P. marginatum* se recolectaron en la provincia de Guantánamo en el mes de mayo del 2009. El material vegetal se seleccionó, de forma tal que no estuviera dañado, y se procesó fresco. El aceite esencial se extrajo por el método de hidrodestilación empleando un equipo Clevenger según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (6), durante tres horas. El aceite se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se guardó en refrigeración hasta su análisis.

Determinación de la CMI y CMB del aceite esencial

Se utilizó la bacteria fitopatógena *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson perteneciente al cepario de bacterias del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). *X. albilineans* se aisló de muestras procedentes de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Jovellanos y se identificó mediante métodos moleculares (7).

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 concentración de inóculo de $1-2 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹, equivalente a una densidad óptica de 1, a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite. La CMI se estableció usando el método de las diluciones seriadas (8). Las pruebas fueron realizadas en medio líquido Wilbrink utilizando Tween 80 (0,5%) como agente solubilizante. Diluciones dobles seriadas del aceite fueron preparadas en tubos de ensayo a partir de una solución madre al 0,4% (rango de concentraciones de 0,025 a 0,4%).

Los tubos se inocularon con las suspensiones bacterianas pero ajustando la concentración para que cada tubo contuviera aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ después de la inoculación. Cada prueba fue realizada por triplicado y fueron incluidos controles de crecimiento bacteriano que contenían Tween 80 en igual concentración. La temperatura y tiempo de incubación fueron los establecidos para el crecimiento de la bacteria. La CMI fue determinada como el primer tubo, en orden ascendente de concentraciones, en el cual no se observó cambio de turbidez.

La confirmación de las CMI y el establecimiento de la CMB se realizaron removiendo 20 µL de cada tubo donde no se observó crecimiento e inoculándolos en

placas frescas de medio Wilbrink. La CMB fue determinada como la concentración capaz de matar el 99,9% o más de las bacterias.

Fraccionamiento del aceite esencial

El aceite esencial (1 mL) se fraccionó usando una columna seca de Sílica Gel 60H (Merck) (30 g) empaquetada en un embudo con fritas (porosidad 3, diámetro 40 mm). Como fase móvil se utilizaron combinaciones Tolueno y EtOAc de polaridad creciente: tolueno (100%), EtOAc/Tolueno (2,5%; 5% y 10% de EtOAc en Tolueno) y EtOAc (100%); sistema de fase móvil óptimo para lograr un perfil de separación de los componentes del aceite según un análisis de CCD anterior, finalmente la columna se lavó con metanol. Se colectaron un total de 6 fracciones de 25 mL. Estas fracciones se secaron por separado y se determinó su masa y rendimiento.

Los reactivos utilizados fueron de calidad puro para análisis provenientes de la firma Merck.

Determinación de la composición química

La composición química del aceite y sus fracciones se determinó en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890 con un inyector del tipo «split splitless» (relación de split 20:1), acoplado con un espectrómetro de masas de la serie Agilent 05973; ambos provenientes de la firma Agilent Technologies. Se utilizó una columna capilar SPB-5 ($L=15\text{m}$, $DI=0,25\text{mm}$, $f=0,10\ \mu\text{m}$) con una inyección de $2\ \mu\text{L}$. La temperatura del horno fue programada: 60°C (2 min isotérmicos), seguido por una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de $4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y otra de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ desde 100°C hasta 250°C , donde finalmente permaneció durante 5 min isotérmicos. Se usó helio como gas portador con un flujo constante de $1,0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El espectrómetro de masas trabajó en modo scan de adquisición a 70 eV. Se utilizó un analizador cuadrupolar a 150°C de temperatura del cuadrupolo. El detector trabajó en un intervalo de masas hasta 800 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 280°C y 230°C respectivamente. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275.

Ensayos de actividad antibacteriana del aceite y sus fracciones

Para evaluar la sensibilidad de este microorganismo al aceite esencial y sus fracciones se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos (9), basada en el método de Kirby-Bauer.

Discos de papel de filtro Whatman de 6 mm de diámetro se depositaron cuidadosamente de forma equidistante sobre el medio inoculado con $20\ \mu\text{L}$ de las suspensiones bacterianas (concentración de inóculo de $1-2 \times 10^{10}\ \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$) y posteriormente se les adicionó 10; 5 y $2,5\ \mu\text{L}$ del aceite y sus fracciones. Se colocaron dos papeles impregnados en cada dosis de los extractos y dos papeles control (sin extracto) en cada placa. La bacteria fue incubada durante 48 horas a 28°C . Una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano y la inhibición se clasificó según la escala de Toda *et al.* (10). La evaluación se realizó por cuatuplicado y se empleó un control del crecimiento bacteriano y un control positivo de Kanamicina ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$) (MINSAP).

En el bioensayo se emplearon las soluciones obtenidas al disolver por separado los residuos correspondientes a cada fracción en el mismo volumen de acetona. Se utilizó un control de acetona.

Los resultados de las diferentes dosis evaluadas del aceite y sus fracciones fueron comparados a través de un análisis de varianza, empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan, paquete estadístico SAS 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CMI y la CMB coincidieron, con un valor de $0,12\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aliannis *et al.* (11) consideraron una fuerte actividad antibacteriana, valores de CMI entre $0,05-0,5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, actividad moderada para valores entre $0,6-1,5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y valores superiores a $1,5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ corresponden con una débil actividad. En este caso el aceite evaluado presentó una fuerte actividad bactericida frente a *X. albilineans* lo que demuestra sus potencialidades para el control de esta bacteria, resultados que llevan a estudios más profundos de fraccionamiento y actividad biológica.

De las fracciones obtenidas resultó más activa F2 (Tabla 1), la misma mostró una inhibición total del crecimiento de *X. albilineans* y no la formación de halos de inhibición alrededor del disco. El aceite puro también evidenció una marcada inhibición del crecimiento bacteriano.

En el aceite, como en todas sus fracciones existe un predominio de compuestos oxigenados, fundamentalmente fenilpropanoides oxigenados, estrechamente relacionados desde el punto de vista químico (Tabla 2).

Un análisis de los componentes mayoritarios del aceite: isosafrol y notosmimol (Figura 1), reveló igual proporción (1,6 aproximadamente) de los mismos en

TABLA 1. Actividad antibacteriana frente a *X. albilineans* del aceite esencial de *P. marginatum* y sus fracciones./ *Antibacterial activity againsts X. albilineans of P. marginatum essential oil and its fractions*

Tratamiento	Dosis (µL)	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
		10	5	2,5
<i>P. marginatum</i>		87,5±1,4 ^b	80±0 ^b	70±0 ^b
F1		6±0 ^f	6±0 ^e	6±0 ^e
F2		90±0 ^a	90±0 ^a	80±0 ^a
F3		19,5±0,6 ^d	15,7±0,9 ^d	15,2±0,9 ^c
F4		6±0 ^f	6±0 ^e	6±0 ^e
F5		15,5±0,6 ^e	14,0±0,9 ^d	10,5±0,6 ^d
F6		27,5±1,5 ^c	19,5±0,6 ^c	11,5±1,3 ^d

Letras diferentes, en una misma columna, indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)./ *Different letters in a column, indicate significant differences ($p \leq 0,05$).*

TABLA 2. Rendimiento y composición química del aceite esencial de *P. marginatum* y sus fracciones./ *Yield and chemical composition of P. marginatum essential oil and its fractions*

Componentes	t _r (min)	Cantidad Relativa (%)						
		PM	F1	F2	F3	F4	F5	F6
		2,18 % (v/m fresca)	0,001g; 0,09 %	1,11 g; 79,44%	0,102 g; 7,28 %	0,018g; 1,27 %	0,12 g; 8,43 %	0,05 g; 3,48 %
estragol	8,97	0,88		0,95				
trans-anetol	10,64	0,83		0,98	3,42			
isosaftrol	12,22	37,31	4,21	56,72		6,66		
safrol	12,25	7,02	4,21					
bicicloelemeno	13,06	0,24		0,2				
β- elemeno	14,21	0,05		0,4				
metil eugenol	14,69	7,32				10,78	68,39	0,12
miristicina	15,52	4,33		5,2	2,62			
α-copaeno	15,68	0,04						
biciclogermacreno	15,98	0,94		1,1				
isocroweacina	16,01	0,28		0,18				
notosmirnol	16,37	22,72		34,21	37,42	40,27	5,72	
derivado del metileugenol	16,53	7,5						
elemol	16,83	0,74					0,57	17,52
elemecina	16,92	0,18		0,34			1,28	
nerolidol	16,99	0,17					1,42	
euasarona	17,17	1,33				0,75	12,54	
dilapiol	17,74	0,2	3,37		0,54			
3,4-ácido dimetoxicinámico	17,78	0,28			0,49	16,29		
β- eudesmol	18,03	0,05						2,26
α-eudesmol	18,07	0,06						2,57
asarona	18,48	1,01					8,91	
trans- α-asarona	18,93	5,88			55,27	7,61		

t_r: tiempo de retención; PM: aceite esencial de *P. marginatum*

el aceite sin fraccionar y en la fracción F2, estadísticamente más activa que el aceite. Las diferencias relacionadas con la actividad del aceite y la fracción F2 pudieran deberse a las cantidades relati-

vas de estos componentes dentro de la mezcla, esta fracción se encuentra enriquecida en isosaftrol y notosmirnol (notosmirnol + isosaftrol: 90,93%) en relación con el aceite (notosmirnol + isosaftrol: 60,30%).

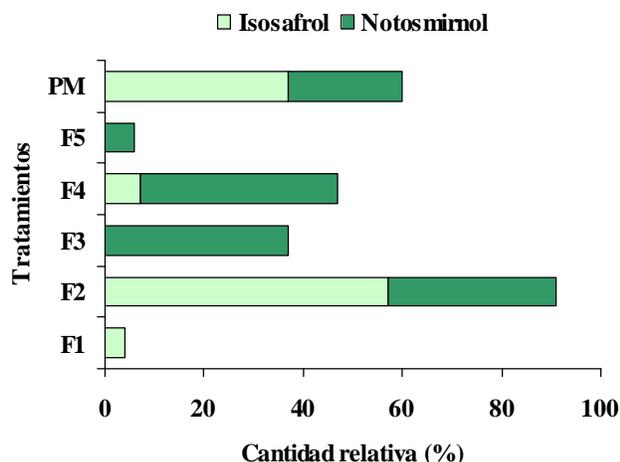


FIGURA 1. Composición relativa de isosafrol y notosmimol en el aceite de *P. marginatum* y sus fracciones./ Relative composition of isosafrole and nothosmyrnon in *P. marginatum* essential oil and its fractions.

Otra posible explicación al efecto antimicrobiano más elevado de F2 es la presencia de otros constituyentes dentro del aceite que antagonizan la actividad de los componentes bioactivos.

Esta fuerte actividad de F2, en relación con el resto de las fracciones, no solo es atribuible a la presencia de isosafrol y notosmimol en la proporción observada, sino también a su alto rendimiento dentro del aceite, 79% aproximadamente, considerablemente mayor que el del resto de las fracciones.

Otras fracciones también mostraron actividad por lo que se puede inferir que existen otros componentes con actividad antibacteriana. En este sentido, se conoce la actividad del safrol y de compuestos como el eugenol y metileugenol (12). Además, algunos de estos compuestos tienen acción sinérgica; por ejemplo la miristicina tiene efecto sinérgico con insecticidas muy conocidos como el carbaril, multiplica por cinco la toxicidad de la xantocumarina sobre orugas de *Helicoverpa* (13). Compuestos como el eugenol, dilapiol y safrol son conocidos también por sus efectos sinérgicos, desde el momento que se ponen en contacto con moléculas de actividad biológica bien establecida, se comprueba un incremento sensible de la toxicidad (14).

En la mayoría de los aceites esenciales extraídos de las plantas los responsables de la acción biológica son los constituyentes oxigenados y no los hidrocarburos (15), lo que justifica los resultados obtenidos. Además, los aceites con un alto porcentaje de com-

puestos terpenoides del tipo fenólicos poseen notables propiedades antimicrobianas (16,17,18). En este sentido, se pudiera atribuir la acción bactericida del aceite esencial en estudio y sus fracciones, fundamentalmente, a la presencia de los fenilpropanoides oxigenados: isosafrol y notosmimol.

La identificación de los componentes del aceite esencial asociados al efecto bactericida resulta decisiva para establecer los indicadores de calidad de la materia prima, el proceso de obtención y del antibacteriano comercial, que puede desarrollarse a partir de estos aceites y/o sus componentes.

En la literatura aparecen numerosos informes sobre la actividad antibacteriana de aceites esenciales. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios relacionados con la relación estructura actividad y con el modo de acción de estos productos naturales en la célula bacteriana. La base de esta actividad puede estar dada por el carácter lipofílico de los constituyentes de los aceites esenciales. Esta propiedad de sus moléculas hace que interactúen con componentes de la membrana de la célula bacteriana y pueden influir en la permeabilidad de la misma, canales iónicos, receptores o enzimas integradoras de membranas como la ciclooxygenasa y lipooxygenasa (19), además de posibles efectos sobre la respiración y el contenido de ATP en las células (20).

Los resultados obtenidos han contribuido al estudio de esta especie aromática, investigada por primera vez en el país desde el punto de vista químico y como posible antibacteriano, logrando identificar la naturaleza química de algunos principios activos con potencialidades para el control de *X. albilineans*, esto permitirá un mejor aprovechamiento de los recursos naturales con los que cuenta el país, propiciará la explotación sostenible de nuevos productos, considerando su estandarización y el establecimiento de parámetros de calidad confiables.

La actividad antibacteriana marcada de este aceite y algunas de sus fracciones frente a *X. albilineans*, establecida por primera vez como resultado de este trabajo, representa una gran contribución no solo desde el punto de vista cognoscitivo sino también práctico para el control de la escaldadura foliar, enfermedad más importante de la caña de azúcar en todo el mundo (1).

Las perspectivas de desarrollo como agente antibacteriano del aceite esencial de *P. marginatum* se incrementan considerando su elevado rendimiento y su fuerte actividad bactericida frente a esta importante bacteria.

REFERENCIAS

1. 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;21(2): 139-142.
2. Rott P. Leaf scald of sugarcane. *Agriculture and Development*. CIRADCA. 1995: 51-58.
3. Isman M B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*. 2006;51:45-66.
4. Pino J, Márquez E, Marbot R. Volatile constituents from tea of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2006;37:127-129.
5. Pino JA, Cuevas LF, Marbot R, Fuentes V. Volatile compounds of grosella (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels) fruit. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 2008;39(1):2-4.
6. International Standardization Organization. ISO 65-71. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).
7. Iglesia A, Díaz M, Álvarez E, Arocha Y. Diagnóstico de enfermedades bacterianas de la caña de azúcar en Cuba. En: VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba. 2008 Sept. (Conferencia).
8. Ababouch L, Bouqartacha F, Busta FF. Inhibition of *B. cereus* by fatty acids and monolaurin. *Food Microbiol*. 1994;11:327-336.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 1997;17:234-238.
10. 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.
11. Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou I B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*. 2001; 40: 4168-4170.
12. Sharma M, Thekkayil S, Bhandari A, Raviraj CD, Shah M. Phytonutrient profile of cinnamon (*Cinnamomum verus*). 111 Natural phytonutrients. 339 Synergistic activities with no side effects plant clinical studies. *India Herbs*, 2010.
13. Regnault-Roger C, Philogène BJR, Vincent C. Biopesticidas de origen vegetal. Mundi-Prensa Libros, S.A.: Madrid. 2004; 337 Pp.
14. Bernard CB, Krishnamurthy HG, Chauret D, Durst T, Philogène BJR, Sánchez-Vindas I, et al. Insecticidal defenses of *Piperaceae* from the neotropics. *J Chem Ecol*. 1995;21(6):801-814.
15. Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet* 2006. 4 Pp. Consultado en: julio, 2010. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>.
16. López LMT. Tomillo. Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Fitoterapia*. 2006 Ener; 25(1):74-77.
17. Raybaudi-Massilia RM, Soliva RF, Martín OB. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, SP Brazil. 2006:15-21.
18. Kotan R, Kordalic S, Cakird A. Screening of Antibacterial Activities of Twenty-One Oxygenated Monoterpenes. *Z Naturforsch*. 2007;62c:507-513.
19. Miller T, Wittstock U, Lindequist U, Teuscher E. Effects of some components of Essential Oil of Chamomile, *Chamomilla recutita*, on Histamine Release from Rat Mast cells. *Planta médica*. 1996;62:60-61.
20. Barel S, Yashphe J. Effect of the Essential Oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* Cells. *Current Microbiology*. 1989;19:337-341.

(Recibido 3-1-2011; Aceptado 3-10-2011)