

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson

Yaíma Sánchez^I, Teresa M. Correa^{II}, Yudith Abreu^I, Oriela Pino^I

^IDepartamento de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: ysanchez@censa.edu.cu. ^{II}Laboratorio Anti-doping, Instituto de Medicina Deportiva (IMD). Dirección Postal: 100 y Aldabó, Boyeros, La Habana, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue identificar el(los) componente(s) del aceite esencial de *Piper auritum* asociado(s) al efecto antibacteriano sobre *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. El aceite esencial de *P. auritum* se obtuvo por hidrodestilación empleando un equipo Clevenger. 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 ambas bacterias. Se identificaron los componentes responsables de la actividad biológica mediante el análisis por CG/EM y evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones del aceite esencial, obtenidas por cromatografía seca. El aceite mostró una fuerte actividad antibacteriana con CMI y CMB de 0,12 y 0,25 mg.ml⁻¹ frente a *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris*, respectivamente. El principal componente responsable de la actividad biológica observada fue el safrol; sin embargo, el aceite esencial en su conjunto reúne todos los requisitos para ser utilizado como antibacteriano promisorio.

Palabras clave: aceite esencial, *Piper auritum*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, productos naturales.

Effect of the essential oil of *Piper auritum* Kunth and its components against *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson

ABSTRACT: The aim of this study was to identify the component (s) of the essential oil of *Piper auritum* associated with the antibacterial effect against *Xanthomonas albilineans* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. The essential oil of *P. auritum* was obtained by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against both bacteria 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 investigated by GC / MS and tested against the above mentioned bacteria. This oil has a strong antibacterial activity with MIC and MBC of 0,12 and 0,25 mg.ml⁻¹ against *X. albilineans* and *X. campestris* pv. *campestris*, respectively. The principal component responsible for the observed biological activity was safrole; however, the whole essential oil met all the requirements for being used as a promissory antibacterial agent.

Key words: essential oil; *Piper auritum*; *Xanthomonas albilineans*; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; natural products.

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* ha sido objeto de estudios fitoquímicos y biológicos, motivados por sus numerosas aplicaciones etnobotánicas (1) y por ser particularmente útiles como antivirales, antimicóticos y antibacterianos (2,3,4). Existen estudios relacionados

con la actividad antimicrobiana de las especies de *Piper*, pero generalmente encaminados al control de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas importantes en humanos, como *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Escherichia coli* (Theodore von Escherich)

Migula y los hongos *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *Aspergillus niger* P.E.L. Van Tieghem, *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus fumigatus* Fresenius (5,6).

Dentro de este género se destaca la especie *Piper auritum* Kunth, natural de México, América Central, América del Sur y las Antillas y naturalizada en toda Cuba (7). Se estudió extensamente la actividad insecticida, antibacteriana y antifúngica de diferentes extractos de la planta, dentro de ellos, sus aceites esenciales (8,9,10). Existe información relacionada con las propiedades antibacterianas de esta especie sobre *Mycobacterium tuberculosis* Koch, *Mycobacterium smegmatis* Lehmann y Neumann y *B. subtilis* (11,12). La acción de su aceite esencial frente a bacterias fitopatógenas fue menos estudiada, aunque se informó su efecto sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson (los serovares I y III) y *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Manns) Willems *et al.* (4,9).

X. albilineans es la responsable de la escaldadura foliar, considerada la enfermedad bacteriana más importante del cultivo de la caña de azúcar (13), mientras que *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dawson es la responsable de la pudrición negra de las crucíferas; enfermedad de relevancia en estos cultivos (14). Resultan insuficientes aún las opciones para el control de estas enfermedades bacterianas, y la búsqueda de alternativas, basadas en productos naturales, específicamente en aceites esenciales y sus componentes; podría ofrecer solución a algunos de los problemas que actualmente existen, lo que resultará de inestimable valor para la protección fitosanitaria de los sistemas afectados.

El objetivo de este trabajo fue identificar el(los) componente(s) del aceite esencial de *P. auritum* asociado(s) al efecto antibacteriano sobre *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris*; responsables de daños en los cultivos de caña de azúcar y crucíferas, respectivamente, en Cuba y el resto del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del aceite esencial

Las hojas de *P. auritum* se recolectaron en la provincia de Mayabeque entre los meses de enero a octubre del 2009. El material vegetal 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 (15), durante tres horas. El aceite se secó sobre sulfato de sodio anhidro (puro para análisis, AppliChem) y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial

Se utilizaron las bacterias fitopatógenas *X. albilineans* (J_R) y *X. campestris* pv. *campestris* (X_{C2}) pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del CENSA. La bacteria *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 (16); mientras que *X. campestris* pv. *campestris*, procedente de muestras de tomate, se aisló y caracterizó mediante técnicas morfológicas y bioquímicas en el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

X. albilineans se sembró en medio Wilbrink (BDH) y se incubó a 28°C durante 48 horas, mientras que *X. campestris* pv. *campestris* se sembró sobre placas de agar nutriente (Biocen) y se incubó a igual temperatura durante igual período de tiempo. Una vez activadas las bacterias, se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina estéril (Cloruro de sodio (Merck) al 0,85%), hasta lograr una concentración de inóculo de 1-2 x 10¹⁰ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml, equivalente a una densidad óptica de 1, a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (T90 + UV/Vis Spectrometer PG Instruments Ltd).

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 (17). Las pruebas se realizaron en medio líquido Wilbrink, utilizando Tween 80 (Merck) (0,5%) como agente solubilizante. Diluciones dobles seriadas del aceite se prepararon 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, ajustando la concentración para que cada tubo contuviera aproximadamente 1-2 x 10⁸ UFC.ml⁻¹ después de la inoculación. Cada prueba se realizó por triplicado y se incluyeron controles de crecimiento bacteriano que contenían Tween 80 en igual concentración. La temperatura y tiempo de incubación fueron los establecidos para el crecimiento de las bacterias. La CMI se determinó 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 sólido. La CMB se determinó

como la concentración capaz de inhibir 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 de Hexano y EtOAc de polaridad creciente: Hexano (100%), EtOAc/Hexano (2,5%; 5% y 10% de EtOAc en Hexano) 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. Los reactivos utilizados fueron de calidad puro para análisis, provenientes de la firma Merck. Se recolectaron 6 fracciones de 25 ml. Estas fracciones se secaron por separado y se determinó su masa y rendimiento.

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=15m, DI=0,25mm, f=0,10µm) con una inyección de 2 µl. La temperatura del horno se programó: 60°C (2 min isotérmicos), seguido por una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de 4°C.min⁻¹ y otra de 10°C.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 ml.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 realizó mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275.

Ensayo de actividad antibacteriana del aceite y sus fracciones

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos 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 (18), 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 µl de las

suspensiones bacterianas (concentración de inóculo de 1-2 x 10¹⁰ UFC.ml⁻¹) y posteriormente se les adicionó 10; 5 y 2,5 µl 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. Las bacterias se incubaron durante 48 horas a 28°C. Una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano. La evaluación se realizó por cuatuplicado y se empleó un control del crecimiento bacteriano y controles positivos de Kanamicina (10 µg/disco) y Gentamicina (10 µg/disco), producidos por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP, Cuba), para *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris* respectivamente.

En el bioensayo se emplearon las soluciones obtenidas al disolver por separado los residuos correspondientes a cada fracción en el mismo volumen de acetona (puro para análisis, Merck). Se utilizó un control de acetona. Los resultados de las diferentes dosis del aceite evaluadas y sus fracciones, se compararon a través de un análisis de varianza, empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan, paquete estadístico SAS 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aligiannis *et al.* (19) consideraron que la actividad antibacteriana es fuerte cuando los valores de CMI se encuentran entre 0,05-0,5 mg.ml⁻¹, moderada para valores entre 0,6- 1,5 mg.ml⁻¹ y valores superiores a 1,5 mg.ml⁻¹ corresponden con una actividad débil. La actividad del aceite de *P. auritum* sobre las dos bacterias estudiadas es fuerte, con CMI, que coincide con la CMB en ambos casos, de 0,12 y 0,25 mg.ml⁻¹ frente a *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris* respectivamente.

Este resultado es importante desde el punto de vista práctico, si se consideran las afectaciones ocasionadas por estas bacterias en la agricultura. Además, las medidas fitosanitarias y la disponibilidad de productos eficaces para su manejo, son insuficientes, lo que aumenta la necesidad de nuevas alternativas para la disminución de las pérdidas que ellas ocasionan.

Las fracciones de *P. auritum* con mayor actividad frente a *X. albilineans* fueron F4 y F5, con una inhibición total del crecimiento bacteriano a la máxima dosis evaluada. En el caso de *X. campestris* pv. *campestris* solamente fue ligeramente activa la fracción F4. Se destacan además, con una actividad elevada frente a *X. albilineans* las fracciones F3 y F6 (Tabla 1). Estas fracciones coinciden con el mayor contenido de compuestos oxigenados en el fraccionamiento, específicamente safrol (Figura).

TABLA 1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Piper auritum* y sus fracciones sobre *Xanthomonas albilineans* y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*./ *Antibacterial activity of the essential oil of Piper auritum and its fractions on Xanthomonas albilineans and Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Bacteria	Dosis (µl)	Halo de inhibición (mm)						
		AE	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<i>X. albilineans</i>	10	90±0 ^a	6±0 ^c	6±0 ^c	38,5±2,8 ^b	90±0 ^a	90±0 ^a	41,3±1,3 ^b
	5	90±0 ^a	6±0 ^c	6±0 ^c	37,5±1,2 ^b	54,0±20,8 ^b	27,8±11,5 ^{bc}	7,8±0,5 ^c
	2,5	90±0 ^a	6±0 ^c	6±0 ^c	6±0 ^c	12,3±1,7 ^b	6±0 ^c	6±0 ^c
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	10	24,3±4,2 ^a	6±0 ^c	6±0 ^c	6±0 ^c	10,5±0,7 ^b	6±0 ^c	6±0 ^c
	5	14,5±0,5 ^a	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b
	2,5	12,7±1,6 ^a	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b	6±0 ^b

Letras diferentes, en una misma fila, indican diferencias significativas (p≤0,05)

AE: aceite esencial de *Piper auritum*; F1, F2, F3, F4, F5 y F6: fracciones del aceite esencial obtenidas en columna seca empleando como fases móviles Hexano (100%), EtOAc/Hexano (2,5%; 5% y 10% de EtOAc en Hexano), EtOAc (100%) y Metanol (100%) respectivamente.

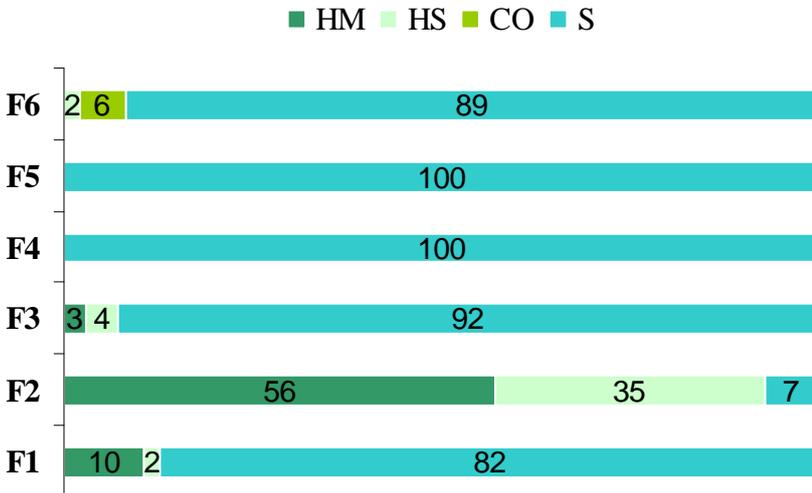


FIGURA. Composición química de las fracciones de *Piper auritum* referida a hidrocarburos monoterpénicos (HM), hidrocarburos sesquiterpénicos (HS), safrol (S) y otros compuestos oxigenados (CO)./ *Chemical composition of the fractions of Piper auritum referred to monoterpene hydrocarbons (HM), sesquiterpene hydrocarbons (HS), safrole (S), and other oxygenated compounds (CO).*

La actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe, en gran medida, a la presencia de terpenoides (20), fundamentalmente los que contienen grupos oxigenados (21,22). De igual forma, se demostró el efecto antimicrobiano de fenilpropanoides presentes en aceites esenciales (10), su carácter lipofílico es capaz de afectar la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares (23) y pueden inhibir enzimas o procesos celulares específicos (24).

En todas estas fracciones, al igual que en el aceite puro, el componente mayoritario es el fenilpropanoide safrol; en el caso de las fracciones F4 y F5, están constituidas por un 100 % de safrol y coinciden con una mayor inhibición del crecimiento bacteriano (Tabla 2). La fracción 4 resultó ser la más activa frente a am-

bas bacterias. Esta diferencia se debe a que esta fracción es la de mayor rendimiento en el fraccionamiento, por lo que la cantidad de safrol es superior a la del resto de las fracciones. La fracción F1, a pesar de tener un contenido de safrol de aproximadamente 82%, su rendimiento fue tan bajo que la cantidad total no resultó suficiente para provocar la inhibición a las dosis evaluadas.

El safrol es uno de los componentes a los que se le atribuyen propiedades antibacterianas (9,25,26), pero no es el único, existen otros como el linalol, timol, carvacrol, eugenol, α-pinene y β-pinene, α-humuleno, β-cariofileno, β-elemeno, germacreno, p-cimeno, γ-terpineno, mirceno, entre otros (27,28), algunos de los cuales se encuentran en el aceite de caisimón de anís evaluado y sus fracciones.

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

Componentes	t _r (min)	Cantidad Relativa (%)						
		AE 0,4 %	F1 0,014g; 1,41 %	F2 0,084g; 8,1 %	F3 0,19g; 19,1 %	F4 0,31 g; 30,5 %	F5 0,21 g; 20,6%	F6 0,20 g; 20,3 %
α -tuyeno	2,36	0,12		0,31				
α-pineno	2,46	1,59	1,5	4,32	0,05			
canfeno	2,7	0,08						
β-pineno	3,19	2,41	2,12	8,84	0,14			
mirceno	3,5	0,24		1,13	0,11			
α-terpineno	4,02	1,04	1,19	5,58	0,43			
p-cimeno	4,20	0,12		0,39	0,13			
limoneno	4,29	0,23		1,23				
trans- β- ocimeno	4,56	0,12		0,71				
cis-ocimeno	4,8	0,16		0,79				
γ-terpineno	5,04	2,77	3,03	18,69	1,32			
α-terpinoleno	5,79	2,13	2,27	15,03	1,2			
linalol	6,17	0,82						1,51
safrol	12,02	84,38	81,51	6,71	92,21	100	100	88,76
α -copaeno	13,89	0,53		6,53	0,2			
β-cariofileno	14,7	1,56	1,61	17,65	1,66			
α -humuleno	15,28	0,14		0,69	0,4			
β-cubebeno	15,74	0,57		4,68	1,51			
biciclo germacreno	15,97	0,30		0,72				0,52
δ-cadineno	16,4	0,20		1,82	0,45			0,48
nerolidol	17,0	0,39						3,36
fitol	22,88	0,12						1,52

tr: tiempo de retención; AE: aceite esencial de *Piper auritum*; F1, F2, F3, F4, F5 y F6: fracciones del aceite esencial obtenidas en columna seca empleando como fases móviles Hexano (100%), EtOAc/Hexano (2,5%; 5% y 10% de EtOAc en Hexano), EtOAc (100%) y Metanol (100%) respectivamente.

El aceite sin fraccionar logra una mayor inhibición del crecimiento bacteriano que sus fracciones por separado, lo que sugiere que existen otros componentes que potencian la acción del safrol dentro del aceite. Se plantea que algunos compuestos que no presentan actividad antimicrobiana de manera independiente, incrementan la acción cuando se mezclan con otros (29).

Además de las propiedades antibacterianas del safrol, se demostró que puede actuar como sinergizante (30,31) y esta pudiera ser la causa de la mayor actividad antibacteriana del aceite inicial, pues es capaz de potenciar la actividad de otros agentes antimicrobianos presentes en el aceite. Se reconoce que en mezclas de compuestos como los aceites esenciales, la interacción entre los componentes resulta importante en la determinación de la actividad biológica y por lo

general son varios los constituyentes responsables del efecto (29,32).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes encontrados en la literatura consultada y los resultados obtenidos, se pudiera atribuir al safrol la mayor contribución a la acción bactericida y/o bacteriostática del aceite esencial de *P. auritum*. Esto permite disponer de un conocimiento sobre la composición química de los aceites que se correlaciona con el efecto biológico deseado, aspecto importante para enfrentar el reto que representa la estandarización de mezclas complejas de materiales vegetales.

Sin embargo, la mayor actividad del aceite en comparación con sus fracciones resulta importante desde el punto de vista económico. En la práctica, la adición de pasos de fraccionamiento en el proceso de obtención de principios activos para el desarrollo de

plaguicidas, encarece el proceso de producción; y resulta conveniente que en estos casos el principio activo sea precisamente la mezcla de componentes que constituyen el aceite y no uno o varios de ellos por separado. El conocimiento de los componentes responsables de la actividad representa un elemento clave a tener en cuenta para el monitoreo del principio activo del antibacteriano a desarrollar, pues permite contar con indicadores específicos para el control de la calidad en la obtención de productos eficaces y confiables.

Todo esto, unido a la posibilidad de producción de este aceite en cantidades adecuadas sobre bases sostenibles, tanto por la disponibilidad de materia prima (biomasa abundante silvestre y cultivable), como por el proceso de obtención (relativamente simple), hacen del aceite esencial de *P. auritum* un candidato promisorio para el desarrollo de antibacterianos destinados al control de la escaldadura foliar de la caña de azúcar y la podredumbre negra de las crucíferas.

REFERENCIAS

1. Silva DR, Endo EH, Filho BPD, Nakamura CV, Svidzinski TIE, Souza A, *et al.* Chemical composition and antimicrobial properties of *Piper ovatum* Vahl. *Molecules*. 2009;14:1171-1182.
2. Pino O, Sánchez Y, Rodríguez H, Correa TM, Demedio J, Sanabria JL. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente a *Varroa destructor*. *Rev Protección Veg*. 2011;26(1):52-61.
3. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Martínez B, Duarte Y, Pino O. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Rev Protección Veg*. 2011;26(3):170-176.
4. Sánchez Y, Pino O, Jorge FL, Abreu Y, Naranjo E, Iglesia A. Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu *Pipereae* frente a *Artemia salina* y *Xanthomonas albilineans*. *Rev Protección Veg*. 2011;26(1):45-51.
5. Pino BN, Melendez E, Stashenko EE. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2009;8(4):301-304.
6. Salleh WMNH, Ahmad F, Yen KH, Sirat HM. Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Piper caninum* Blume. *Int J Mol Sci*. 2011;12(11):7720-7731.
7. Saralegui H. *Piperaceae*. Pp. 94. En: Jreuter W & Rankin R (eds). *Flora de la República de Cuba. Serie A, Plantas vasculares*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books. 2004;9(3):1-5.
8. Leyva M, Marquetti MC, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, Montada D. Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed*. 2009;20:5-13.
9. Sánchez Y, Pino O, Correa TM, Naranjo E, Iglesia A. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís). *Rev Protección Veg*. 2009;24(1):39-46.
10. Pineda MR, Vizcaíno PS, García PC, Gil GJ, Durango RD. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. *Chilean J Agric Res*. 2012;72(4):507-515.
11. Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko EE, Ribon W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica*. 2009;29(1):51-60.
12. Cruz S. Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de Piperaceas [Tesis]. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2005.
13. Jiménez O, Contreras N. 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.
14. Bermúdez-Cañete MC, Nieto RPR. El papel biológico de las xantomonadinas en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Serie Fisiología Vegetal*. 2009;2(3):108-112.
15. International Standardization Organization. ISO 65-71. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984. [Norma ISO].

16. Díaz MR. Escaldadura foliar de la caña de azúcar en Cuba: caracterización, diversidad y diagnóstico molecular de su agente causal *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson [Tesis]. Universidad Agraria de La Habana: Cuba; 2000.
17. Ababouch L, Bouqartacha F, Busta FF. Inhibition of *B. cereus* by fatty acids and monolaurin. Food Microbiol. 1994;11:327-336.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 1997;17:234-238.
19. Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 2001; 40: 4168-4170.
20. Mitić-Ćulafić D, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, Stanković S, Simić D. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). Arch Biol Sci., Belgrade. 2005;57(3):173-178.
21. 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.
22. Vera RJ, Paastrana PF, Fernández K, Viña A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento de Tolima. Scientia et Técnica. 2007;XIII(33):345-348.
23. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. J. Ethnopharmacol. 2010;130:107-115.
24. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. J Food Protect. 1993;56:410-413.
25. Barbosa QPS, da Câmara CAG, Ramos CS, Nascimento DCO, Lima-Filho JV, Guimarães EF. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. Quím Nova. 2012;35(9):1806-1808.
26. Montenegro I, Madrid VA, Zaror L, Martínez R, Werner E, Carrasco-Altamirano H, *et al.* Antimicrobial activity of ethyl acetate extract and essential oil from bark of *Laurelia sempervirens* against multiresistant bacteria. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2012;11(4):306-315.
27. 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.
28. Mendonça LZ, Graças MC, Estevão PS, Araujo FP, de Lima LGG, Soares APPS. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Acta Amazonica. 2009;39(1):193-198.
29. Bassole IHN, Nebie R, Savadogo A, Ouattara CT, Barro N, Traore SA. Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. Afr. J. Biotechnol. 2005;4(10):1156-1160.
30. 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.
31. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446-475.
32. Sánchez Y, Correa TM, Abreu Y, Pino O. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. Rev Protección Veg. 2012;27(1):39-44.

Recibido: 6-9-2013.
Aceptado:30-10-2013.