

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper marginatum* Jacq.

Yaíma Sánchez\*, Teresa M. Correa\*\*, Yudith Abreu\*, B. Martínez\*, Yanisia Duarte\*, Oriela Pino\*

\*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: [ysanchez@censa.edu.cu](mailto:ysanchez@censa.edu.cu); \*\*Laboratorio Anti-doping, Instituto de Medicina Deportiva (IMD). Dirección Postal: 100 y Aldabó, Boyeros, La Habana. Cuba.

**RESUMEN:** El uso de antimicrobianos de origen natural es una alternativa que está en vía de desarrollo y explotación y, dentro de ellos, los aceites esenciales tienen grandes potencialidades. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica frente a microorganismos de importancia en la esfera agrícola. 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 cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Pammel) Dawson, *Pseudomonas solanacearum* Smith, *Pseudomonas celebensis* Gäumann, *Pseudomonas syzygii* Roberts et al. y *Pseudomonas fluorescens* Migula. El efecto antifúngico del aceite se determinó sobre *Alternaria solani* Sor. El aceite esencial (2,18 % v/p) está constituido fundamentalmente por compuestos oxigenados y dentro de ellos los componentes mayoritarios resultaron ser el isosafrol y el notosmirnol. El aceite mostró un efecto bactericida frente a *X. albilineans* y *X. campestris* pv *campestris* y efecto fungistático frente a *A. solani*. Existen enormes posibilidades de desarrollo del aceite esencial de *P. marginatum* como agente antimicrobiano, considerando su elevado rendimiento y su actividad frente a los microorganismos estudiados.

(Palabras claves: aceite esencial; *Piper marginatum*; actividad antimicrobiana; Cuba)

---

## CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Piper marginatum* Jacq.

**ABSTRACT:** The use of natural antimicrobials is an alternative that is in development and exploitation and, among them, the essential oils have a great potential. The aim of this work was to determine the chemical composition of essential oil of *Piper marginatum* Jacq. and evaluate its antibacterial and antifungal activities against microorganisms of importance in the agricultural sphere. The essential oil of *P. marginatum* was obtained by hydrodistillation using an apparatus type Clevenger. Its yield was determined and its chemical composition was investigated by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The antibacterial activity was evaluated by the agar diffusion method against *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Pammel) Dawson, *Pseudomonas solanacearum* Smith, *Pseudomonas celebensis* Gäumann, *Pseudomonas syzygii* Roberts et al. and *Pseudomonas fluorescens* Migula. The antifungal effect of the oil was determined on *Alternaria solani* Sor. The essential oil (2,18% v/p) is constituted mainly of oxygenated compounds with isosafrole and nothosmyrnlol as the major components. The oil showed a bactericidal effect against *X. albilineans* and *X. campestris* pv *campestris* and a fungistatic effect against *A. solani*. There are great opportunities for the development of the essential oil of *P. marginatum* as an antimicrobial agent, considering its high yield and activity against the microorganisms studied.

(Key words: essential oil; *Piper marginatum*; antimicrobial activity; Cuba)

---

## INTRODUCCIÓN

La resistencia de los microorganismos a los fármacos y plaguicidas existentes, es un problema que tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene la búsqueda de nuevos antimicrobianos para combatir las enfermedades, superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles (1,2). Desde el punto de vista fitosanitario, la demanda creciente de nuevos antimicrobianos responde también a la poca disponibilidad y/o eficacia de los productos existentes para el control de algunos patógenos. Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control y una de las opciones que está en vía de desarrollo y explotación es el uso de antimicrobianos de origen natural y, dentro de ellos, los aceites esenciales tienen grandes potencialidades.

*Piper marginatum* Jacq., perteneciente al género *Piper*, familia Piperaceae, es una especie aromática que se encuentra distribuida a lo largo de toda la isla. Se le atribuyen propiedades medicinales: antiséptico, astringente, antihemorrágico y hemostático. Sus hojas contienen gran cantidad de aceite esencial, sustancias tánicas y sustancias de naturaleza alcaloidal de las cuales se derivan fundamentalmente sus propiedades medicinales (3). Sin embargo, el aceite esencial de esta especie constituye una alternativa prometedora y poco explorada en nuestro país como fuente de antimicrobianos y su futura aplicación requiere del desarrollo de investigaciones básicas sobre la química y la actividad biológica de estos compuestos que permitan establecer sus potencialidades, específicamente para el control de enfermedades microbianas de interés agrícola. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición química del aceite esencial de *P. marginatum*, así como su actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Pammel) Dawson, *Pseudomonas solanacearum* Smith, *Pseudomonas celebensis* Gäumann, *Pseudomonas syzygii* Roberts et al. y *Pseudomonas fluorescens* Migula y frente al hongo *Alternaria solani* Sor.

## 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 (4), durante tres horas. El aceite se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se guardó en frío hasta su análisis.

Se calculó el rendimiento mediante la expresión:

$R = (V/M) \cdot 100$ ; donde R: rendimiento (%), V: volumen del aceite esencial (mL) y M: masa del material vegetal (g).

### Determinación de la composición química

La composición química del aceite 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 fue programada: 60°C (2 min isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de 4°C.min<sup>-1</sup>, otra rampa de 10°C.min<sup>-1</sup> 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 mL.min<sup>-1</sup>. 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 rango de masas de 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.

### Ensayos de actividad antibacteriana

Se utilizaron las bacterias fitopatógenas *X. albilineans* (cepa JR), *X. campestris* pv *campestris* (cepa XC2), *P. solanacearum* (cepas 653, 888, 890 y 155), *P. celebensis* (cepas 223 y 224), *P. syzygii* (cepas 001 y 008) y *P. fluorescens* (cepa 042), perteneciente al cepario de bacterias del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del CENSA.

Las bacterias se sembraron en medio Agar Nutriente (Biocen), con excepción de *X. albilineans*, que se sembró en medio Wilbrink (BDH) y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Una vez activadas se prepararon suspensiones bacterianas, hasta lograr una concentración de inóculo de 1-2 x 10<sup>10</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. De este inóculo se tomaron alícuotas de 20 µL y se colocaron en placas estériles con 20 mL del medio agarizado.

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos al aceite esencial se empleó el método de difusión en agar según la técnica estandarizada por el Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos (5), basada

en el método de Kirby-Bauer. Pequeños discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro fueron cuidadosamente depositados de forma equidistante sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas y posteriormente se les adicionó 10  $\mu$ L del aceite. Se colocaron cuatro papeles impregnados con esta dosis del aceite por placa. Las bacterias fueron incubadas durante 48 horas (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.* (6). La evaluación se realizó por cuatuplicado y se empleó un control del crecimiento bacteriano.

Posterior a este experimento se procedió a la evaluación de la actividad antibacteriana de aquellas especies que mostraron sensibilidad. Se utilizó el mismo método y se adicionó 10; 5; 2,5 y 1  $\mu$ L del aceite. Se colocaron dos papeles impregnados en cada dosis de los extractos y dos papeles control (sin extracto) en cada placa. La temperatura y tiempo de incubación coincidieron con el experimento anterior. La evaluación se realizó por cuatuplicado, se empleó un control del crecimiento bacteriano para cada bacteria y controles positivos de Kanamicina (10  $\mu$ g/disco) (MINSAP) y Gentamicina (10  $\mu$ g/disco) para *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris* respectivamente.

#### Determinación de la actividad antifúngica

Se utilizó el hongo fitopatógeno *A. solani* perteneciente al cepario del Laboratorio de Micología Vegetal del CENSA. El hongo se sembró en medio Agar Papa Dextrosa (Biocen) y se incubó a 28°C (72 horas).

El efecto antifúngico por contacto directo del aceite se determinó empleando el método de discos de micelio. En cada placa se vertieron 10 mL de Agar Papa Dextrosa y a continuación se depositaron cuatro discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro de forma equidistante sobre el medio solidificado. A cada disco se le añadieron 10  $\mu$ L del aceite esencial y se empleó agua destilada estéril como control negativo. Por último, se colocó sobre cada disco de papel de filtro un disco de micelio. La temperatura y el tiempo de incubación fueron de 28°C y 72 horas respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo se midió el diámetro de crecimiento del micelio.

Posteriormente, los discos de micelio se invirtieron y transcurridos 10 días se observó si existía crecimiento del fitopatógeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento del aceite de *P. marginatum* fue de 2,18 % (v/p). Se plantea que aceites esenciales con más de 1% de rendimiento se pueden obtener en can-

tidades suficientes para su comercialización a gran escala (7). Teniendo en cuenta este criterio, el aceite evaluado tiene potencialidades para el desarrollo de un producto cuya obtención sea económicamente factible, por el elevado valor del rendimiento obtenido.

Desde el punto de vista químico, de los 33 componentes detectados fueron identificados total o parcialmente 28, lo que representa un 99,9 % de la composición del aceite (Tabla 1).

En este aceite los compuestos oxigenados representan el 98,28 % y el resto corresponde a hidrocarburos sesquiterpénicos. Dentro de esta cantidad considerable de compuestos oxigenados los principales desde el punto de vista de cantidades relativas son el isosafrol (37,31 %) y el notosmirinol o isosmorizol (22,72 %), se encuentran además el metil eugenol (7,32 %) y un derivado de este (7,5 %), el safrol (7,02 %), la trans- $\alpha$ -asarona (5,88 %) y la miristicina (4,33 %) (Figura 1, 2).

La composición química del aceite de esta especie muestra gran variabilidad en cuanto a los componentes principales; así tenemos que se informó 80,5% de trans-anetol como componente mayoritario de este aceite (8). Ramos *et al.* (9) determinaron la composición química de los aceites esenciales extraídos de hojas y tallos de *P. marginatum* de la región amazónica de Brasil e informaron como componentes mayoritarios de las hojas 3,4-metileno-dioxi propiofenona (8,01%) y  $\beta$ -cariofileno (4,01%) y como componentes mayoritarios de los tallos: miristicina (9,23%), 3,4-metileno-dioxi propiofenona (8,92%) y  $\beta$ -cariofileno (5,57%).

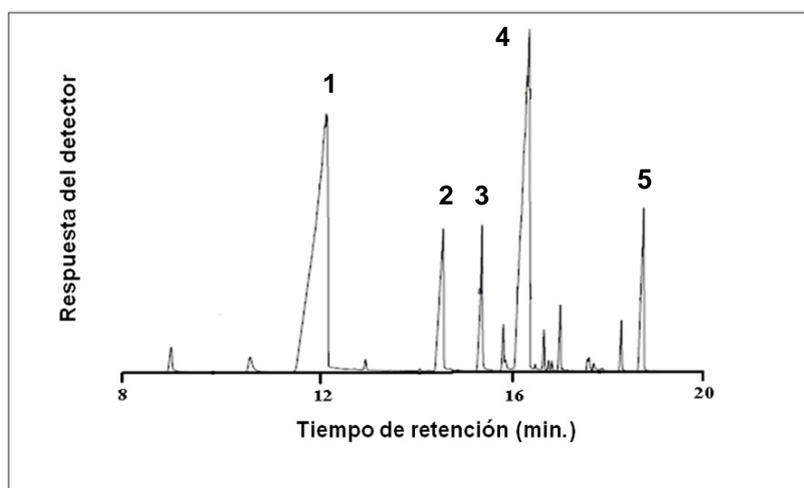
Más recientemente en un estudio realizado con diferentes quimiotipos de la especie informaron safrol y 3,4-metileno-dioxi propiofenona como principales constituyentes del quimiotipo I. En el quimiotipo II predomina 3,4-metileno-dioxi propiofenona y p-menta-1,8 dieno. Los mayores componentes identificados en el quimiotipo III fueron 3,4-metileno-dioxi propiofenona, miristicina, E- $\beta$ -ocimeno y  $\gamma$ -terpineno. En el quimiotipo IV los principales constituyentes fueron  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno y 3,4-metileno-dioxi propiofenona; por su parte, en el quimiotipo V predominó E-isosmorizol y E-anetol; en el quimiotipo VI se encontró fundamentalmente 2-metoxi-4,5-metileno-dioxi propiofenona y E-isosmorizol, mientras que en el quimiotipo VII se identificó como componentes mayoritarios  $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno y E-asarona (10).

Los resultados obtenidos coinciden con los informados por estos autores en cuanto a la presencia de algunos de los componentes separados e identificados, aunque difieren en las cantidades relativas; sin

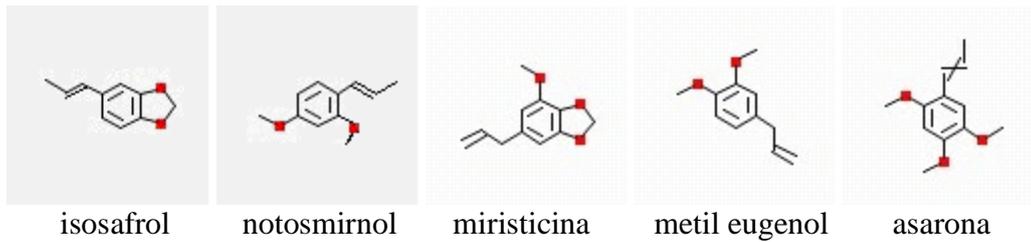
**TABLA 1.** Composición química del aceite esencial de *Piper marginatum*./ *Chemical composition of Piper marginatum essential oil*

Pico	$t_R$ (min)	Abundancia relativa (%)	Identificación
1	8,97	0,88	estragol
2	10,64	0,83	trans-anetol
<b>3</b>	<b>12,22</b>	<b>37,31</b>	<b>isosafrol</b>
4	12,25	7,02	safrol
5	12,85	0,02	trans-isosafrol
6	13,06	0,24	bicicloelemeno
7	14,21	0,05	$\beta$ - elemeno
8	14,41	0,02	No identificado
9	14,69	7,32	metil eugenol
10	14,86	0,06	No identificado
11	15,02	0,02	No identificado
12	15,52	4,33	miristicina
13	15,68	0,04	$\alpha$ -copaeno
14	15,72	0,03	No identificado
15	15,98	0,94	biclogermacreno
16	16,01	0,28	isocroweacina
<b>17</b>	<b>16,37</b>	<b>22,72</b>	<b>notosmirnol</b>
18	16,53	7,5	derivado del metileugenol
19	16,65	0,17	tricyclo [5.3.2.0(1,7)]-2-dodecanon-11-eno
20	16,83	0,74	elemol
21	16,92	0,18	elemecina
22	16,99	0,17	nerolidol
23	17,17	1,33	eusarona
24	17,23	0,04	1,4-dihidro-3,6-dimetilfenantreno
25	17,74	0,2	dilapiol
26	17,78	0,28	3,4-ácido dimetoxicinámico
27	17,88	0,26	1-cicloheptanaftaleno-(2H)-ona
28	17,99	0,02	No identificado
29	18,03	0,05	$\beta$ - eudesmol
30	18,07	0,06	$\alpha$ -eudesmol
31	18,48	1,01	asarona
32	18,93	5,88	trans- $\alpha$ -asarona
33	19,16	0,05	4,6-dimetoxi-5-metilftalida

$t_R$ : tiempo de retención



**FIGURA 1.** Cromatograma del aceite esencial de *Piper marginatum* obtenido por CG: 1) isosafrol, 2) metileugenol, 3) miristicina, 4) notosmirnol, 5) trans-  $\alpha$ - asarona./ *Chromatogram of Piper marginatum essential oil obtained by GC: 1) isosafrole, 2) methyleugenol, 3) miristicin, 4) nothosmyrnol, 5) trans-  $\alpha$ - asarone.*



**FIGURA 2.** Componentes principales del aceite esencial de *P. marginatum*./ *Main components of P. marginatum essential oil.*

embargo, el perfil químico del aceite evaluado no puede ser asociado con ninguno de estos quimiotipos.

Las diferencias encontradas en cuanto a la composición del aceite esencial estudiado y la informada por otros autores para esta especie, pueden estar asociadas a varios factores, entre ellos: las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, precipitaciones, etc), método de cultivo, época de recolección y parte de la planta recolectada, manejo y almacenamiento del material vegetal (seco, fresco, etc), edad y estado fenológico de la planta, así como el método de obtención del aceite (11,12).

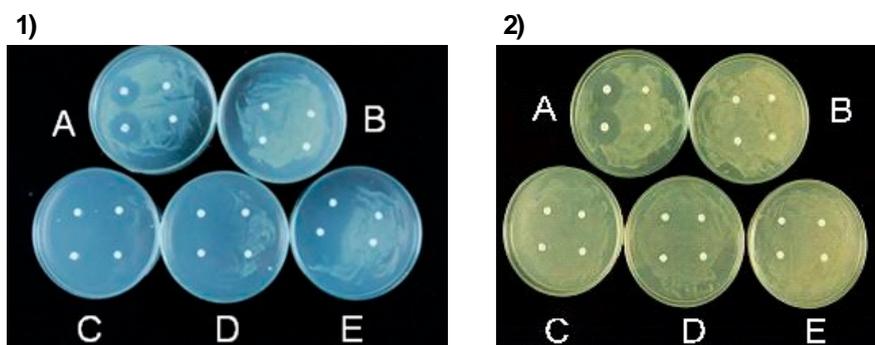
La composición química de los aceites se encuentra estrechamente relacionada con su actividad biológica y el aceite de *P. marginatum* mostró una actividad antibacteriana promisoriosa frente a *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris*, con una inhibición total del crecimiento de ambas bacterias al emplear 10  $\mu$ L del aceite puro, no así para el resto de las bacterias estudiadas.

Para profundizar más en el estudio del aceite frente a las bacterias que mostraron sensibilidad se disminuyeron las dosis a evaluar. Frente a *X. albilineans* se observó una marcada inhibición del crecimiento

bacteriano; con un ligero crecimiento en el borde de las placas hacia la parte de los discos controles. Esta inhibición fue significativamente superior a la observada en el control positivo de Kanamicina (10 $\mu$ g/disco) (diámetro halo de inhibición= 18 mm). En el caso de *X. campestris* pv. *campestris*, a las dosis evaluadas, hubo un crecimiento total de la bacteria (Figura 3). Estos resultados demuestran que *X. albilineans* es la bacteria más sensible a la acción del aceite esencial.

El efecto de la esencia sobre *A. solani* se puso de manifiesto por la inhibición del crecimiento del micelio en el caso del contacto directo en la primera etapa de evaluación (Figura 4). Sin embargo, al invertir los discos de micelio, no se observó actividad, lo que indica un efecto fungistático y no fungicida del aceite. Estos resultados abren nuevas perspectivas para el manejo de este fitopatógeno.

En general, las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales han sido reconocidas durante muchos años y particularmente, existen estudios relacionados con la actividad antimicrobiana de las especies de *Piper*, generalmente encaminadas al control de enfermedades infecciosas importantes en humanos como: *Staphylococcus aureus* Rosenbach,



**FIGURA 3.** Inhibición del crecimiento de las bacterias 1) *Xanthomonas albilineans* y 2) *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*./ *Growth inhibition of 1) Xanthomonas albilineans and 2) Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bacteria. **A:** control positivo: Kanamicina (10  $\mu$ g.disco<sup>-1</sup>) para *X. albilineans* y Gentamicina (10  $\mu$ g.disco<sup>-1</sup>) para *X. campestris* pv. *campestris*; **B:** control de crecimiento bacteriano; **C:** aceite (5  $\mu$ L); **D:** aceite (2,5  $\mu$ L); **E:** aceite (1  $\mu$ L).



**FIGURA 4.** Actividad antifúngica frente a *Alternaria solani*./ Antifungal activity against *Alternaria solani*.

A: Testigo, B: aceite esencial de *Piper marginatum* (10µL).

*Pseudomona aeruginosa* Schroeter, *Escherichia coli* Migula y los hongos *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout, *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus fumigatus* Fresenius (13). En cuanto a la relación estructura actividad de estos aceites, existe poca información pero algunos autores coinciden en que la actividad antimicrobiana presentada por los mismos se debe, en gran medida, a la presencia de terpenoides (14,15); fundamentalmente los que contienen grupos alcoholes, aldehídos y cetónicos (16, 17,18). El aceite de *P. marginatum* está constituido en un 99,9 % por compuestos oxigenados y se pudiera atribuir la actividad biológica observada a sus componentes fundamentales: el notosmirnol, con dos grupos alcohólicos y el fenilpropanoide safrol, a quien se le atribuyen propiedades antimicrobianas.

A pesar del volumen de información existente sobre las características químicas y las propiedades antimicrobianas de especies de este género, la composición química del aceite esencial de *P. marginatum*, se informa por primera vez en nuestro país. De igual forma, no existen precedentes de su acción frente a las bacterias y el hongo en estudio. Estos resultados son particularmente importantes si consideramos que *X. albilineans* y *X. campestris* pv. *campestris* provocan enfermedades de importancia para el cultivo de la caña de azúcar y hortalizas, respectivamente. *X. albilineans* provoca la enfermedad llamada escaldadura foliar, considerada la enfermedad bacteriana más importante del cultivo de la caña de azúcar y causante de pérdidas millonarias en la producción cañera de Cuba y el mundo (19), mientras que *X. campestris* pv. *campestris*, es la responsable de la pudrición negra de las crucíferas, enfermedad de mayor importancia en estos cultivos (20). Por otra parte, *A. solani* afecta varios cultivos de importancia económica entre ellos la papa y el tomate, provocando la enfermedad conocida como tizón temprano, que puede llegar a causar estragos desastrosos (21).

Nuevos antimicrobianos, basados en el aceite esencial de *P. marginatum*, podrían constituir una alternativa para el manejo de plagas de importancia agrícola, tomando en consideración la amplia disponibilidad y facilidad de cultivo de la especie, el elevado rendimiento de extracción de su aceite esencial y actividad biológica frente a microorganismos, así como la gravedad de las afectaciones provocadas por los fitopatógenos estudiados.

## REFERENCIAS

1. Kaya I, Yigit N, Benli M. Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Ocimum basilicum* L. and Observation of the Inhibition Effect on Bacterial Cells by Use of Scanning Electron Microscopy. *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2008; 5(4): 363-369.
2. Zwenger S, Basu Ch. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2008;3(1): 1-7.
3. Saralegui H. *Piperaceae*. En: Jreuter W& Rankin R, editors. Flora de la República de Cuba. Serie A, Plantas vasculares. Fascículo 9(3). Koenigstein: Koeltz Scientific Books; 2004. 94 Pp.
4. International Standarization Organization. ISO 65-71. Spices, condiments and herbs. Determination of volatile oil content. 1984. (Norma ISO).
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 1997; 17: 234-238.
6. Toda M, Okubo S, Mara Y, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins again methicillin resistant *Staphilococcus aureus*. *Jap J Bacteriol*. 1991; 46(5):845-849.
7. Pino JA. Estudio de los componentes volátiles de las hojas de especies de *Myrtaceae* en Cuba. I Congreso Iberoamericano de Química, Bioquímica e Ingeniería Química y VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química: Nuevas Fronteras de la Química; 2009 Octubre, Cuba.
8. Hussain RA, Poveda LJ, Pezzuto JM, Soejarto DD, Kingjorn AD. Sweetening agents of plant origin: Phenilpropanoid constituents of seven sweet-tasting plants. *Econ Bot*. 1990; 44: 174-182.

9. Ramos LS, da Silva ML, Luz AIR, Zoghbi MGB, Maia JGS. Essential Oil of *Piper marginatum*. J Nat Prod. 1986; 49 (4): 712-713.
10. Andrade EH, Carreira LM, da Silva MH, da Silva JD, Bastos CN, Sousa PJ, et al. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chem Biodivers. 2008;5(1): 197-208.
11. Durán DC, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko EE. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. Scientia et Técnica. 2007; 33: 435-437.
12. Mesa A C, Montiel J, Martínez C, Zapata B, Pino N, Bueno J G, Stashenko E. Actividad in vitro anti-cándida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *Piperaceae*. Scientia et Técnica. 2007 Abr; XIII (033): 247-249.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Maguna F P, Romero A M, Garro O A, Okulik N B. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias; 2006.
17. 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.
18. 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.
19. 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. Nota técnica. Bioagro. 2009 Agosto; 21(2).
20. Bermúdez-Cañete MC, Nieto RPR. El papel biológico de las xantomonadinas en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Serie Fisiología Vegetal. 2009; 2 (3): 108-12.
21. Casanova AS, Gómez O, Pupo FR, Hernández M, Chailloux M, Depestre T, et al. Manual para la producción protegida de hortalizas. Segunda Edición, Macaray, Venezuela. 2007 Nov. 103 Pp.

(Recibido 3-1-2011; Aceptado 2-11-2011)