

ARTÍCULO ORIGINAL

**Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

**Miriam M. Rojas Fernández<sup>I</sup>, Mylene Corzo López<sup>I</sup>, Yaima Sánchez Pérez<sup>I</sup>, Deyamín Brito<sup>II</sup>, Rodney Montes de Oca<sup>II</sup>, Yadira Martínez<sup>III</sup>, Oriela Pino Pérez<sup>I</sup>**

<sup>I</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Teléfono: 863014 ext-48. Correo electrónico: [mrojas@censa.edu.cu](mailto:mrojas@censa.edu.cu). <sup>II</sup>Laboratorio Anti-Doping, Instituto de Medicina Deportiva (IMD). 100 y Aldabó, Boyeros, Ciudad de La Habana. Cuba. <sup>III</sup>Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova. Carretera Quivicán-Bejucal km 33½, Quivicán, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** Los aceites esenciales son considerados una importante alternativa para el manejo sustentable de plagas en la agricultura, debido a su reconocida actividad antimicrobiana sobre diversas plagas clave en cultivos de importancia económica. El objetivo de este trabajo fue identificar las potencialidades de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L., *Pimpinella anisum* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck., *Ocimum basilicum* L., *Curcuma longa* L., *Ruta chalepensis* L. y *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake como candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos para el manejo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación empleando un equipo Clevenger, y su evaluación biológica se realizó por el método de difusión en agar. Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Mínimas Bactericidas (CMB) del aceite más promisorio se establecieron por el método de las diluciones seriadas; su composición química se determinó por CG/EM. Al compuesto mayoritario del aceite más promisorio se le determinó las CMI y CMB. Los aceites de albahaca y anís produjeron una inhibición ligera del crecimiento de la bacteria y el de tomillo mostró la actividad antibacteriana más promisoria (CMI = CMB = 0,1%). En la composición química del aceite prevalecen los compuestos monoterpénoides. Los principales constituyentes identificados fueron el timol (57,0%), el p-cimeno (14,7%) y el  $\gamma$ -terpineno (14,1%). El timol evidenció un elevado efecto antibacteriano sobre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (CMI = CMB = 0,2%). Los resultados obtenidos señalan al aceite de tomillo como ingrediente activo promisorio para desarrollar nuevos plaguicidas destinados al manejo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en cultivos de importancia económica.

**Palabras clave:** aceites esenciales, *Thymus vulgaris*, timol, p-cimeno,  $\alpha$ -terpineno, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

---

**Antibacterial activity of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

**ABSTRACT:** The essential oils have been considered an important alternative to sustainable management of pests in agriculture due to their recognized antimicrobial activity against several pests of important economic crops. The aim of this study was to identify the potential of essential oils of *Thymus vulgaris* L., *Pimpinella anisum* L., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck., *Ocimum basilicum* L., *Curcuma longa* L., *Ruta chalepensis* L. and *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake as candidates for the development of new antibacterials. Essential oils were extracted by hydrodistillation using a Clevenger-type equipment and their biological evaluation against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emends. Hauben *et al.* was carried out by agar diffusion method. The minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (MBC) of the most active essential oil was carried out by the serial dilution method and its chemical composition was determined by GC / MS. The MIC and MBC of the main compound from the most active essential oil were determined by the serial dilution method. Among the tested oils, anise and white basil essential oils showed weak activity, whereas the essential oil of thyme showed strong antibacterial activity

against the evaluated bacteria (MIC = MBC = 0.1%). The chemical composition of the oils was characterized by the prevalence of monoterpene and sesquiterpene compounds. Thymol was the main constituents (57.0%), followed by p-cimene (14.7%) and  $\gamma$ -terpinene (14.1%). It exhibited strong antibacterial activity against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (MIC = MBC = 0.2%). The results obtained pointed to the essential oil of thyme as a promising active ingredient for developing new pesticides for the control of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in crops of economic importance.

**Key words:** essential oils, *Thymus vulgaris*, thymol, p-cimene,  $\alpha$ -terpinene, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) es muy importante mundialmente por su elevado rendimiento, y se convirtió en alimento básico por su alto valor nutricional (1). Este cultivo es frecuentemente afectado por enfermedades bacterianas; dentro de las más importantes se encuentra la denominada pudrición blanda, causada por la bacteria fitopatógena *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend. Hauben *et al.* Esta severa y devastadora enfermedad se presenta, además, en otros cultivos de importancia económica como tomate, pimiento, col y berenjena (2).

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* provoca la pudrición de los tubérculos, tanto en campo como en almacenes, y las pérdidas estimadas, mundialmente, son de millones de dólares anuales. La vía más importante de transmisión de la enfermedad es a través de los tubérculos contaminados, donde la bacteria está presente de forma latente en la superficie o en las lenticelas (3). Para el manejo de la enfermedad se utilizan plaguicidas sintéticos, aunque no se dispone de un control efectivo (4). Lograr una producción de semillas libres del patógeno es considerado una de las estrategias más importantes en el control de la propagación del patógeno.

Los plaguicidas de origen botánico están ganando atención por su eficacia, espectro de acción, compatibilidad con otros agentes de control biológico y los problemas asociados al efecto de los productos sintéticos en el medio ambiente y la seguridad de productos y consumidores. Consecuentemente, es cada vez más importante la función que pueden desempeñar en el manejo integrado del cultivo, y evidencia de ello es su lugar en nichos como la producción de alimentos más sanos (5). Los aceites esenciales son considerados una importante alternativa para el manejo sustentable de plagas en la agricultura, debido a su reconocida actividad antimicrobiana sobre diversas plagas en cultivos de importancia económica (6).

El objetivo de este trabajo fue identificar las potencialidades de aceites esenciales de plantas presentes en Cuba como candidatos para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos para el manejo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas evaluadas fueron: *Thymus vulgaris* L. (tomillo), *Pimpinella anisum* L. (anís), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. (naranja dulce), *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca), *Curcuma longa* L. (cúrcuma), *Ruta chalepensis* L. (ruda) y *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake (melaleuca). Diferentes partes de estas se recolectaron las localizaciones geográficas de la región occidental de Cuba (Tabla 1).

Los aceites esenciales se extrajeron, del material vegetal fresco y no dañado, por hidrodestilación con equipo Clevenger durante tres horas, según lo establecido en la norma ISO 65-71:84 (7). Cada aceite se secó sobre sulfato de sodio (Fluka) y se almacenó a 8°C.

La actividad antimicrobiana de los aceites se evaluó frente a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, perteneciente a la colección del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional Sanidad Agropecuaria. La bacteria se sembró por agotamiento en placas que contenían medio de cultivo ácido casamino peptona glucosa (CPG); y se incubó a 28°C durante 24 horas. Una vez crecida, se preparó una suspensión bacteriana, a una concentración de inóculo de aproximadamente 10<sup>8</sup> Unidades Formadoras de Colonia (UFC).ml<sup>-1</sup>, equivalente a una densidad óptica de 0.5, a una longitud de onda de 600nm en un espectrofotómetro (T90 + UV/Vis Spectrometer PG Instruments Ltd). De este inóculo se tomaron alícuotas de 100µl y se sembró en placas con medio CPG por diseminación con espátula de Drigalski.

Para evaluar la sensibilidad de este microorganismo, a los aceites esenciales, se empleó el método de

**TABLA 1.** Datos del material vegetal recolectado y empleado en el estudio./ *Details of the plant material collected and used in the study*

Familia	Especie		Parte de la planta	Localización geográfica/Provincia
	Nombre científico	Nombre común		
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	albahaca blanca	hojas, tallos, flores	Alamar/ La Habana
Apiaceae	<i>Pimpinella anisum</i> L.	anís	hojas	Jagüey Grande/ Matanzas
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	tomillo	hojas, tallos	IIH Liliana Dimitrova/ Mayabeque
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	naranja dulce	pericarpio	Jagüey Grande/ Matanzas
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i> L.	cúrcuma	rizomas	IIH Liliana Dimitrova/ Mayabeque
Rutaceae	<i>Ruta chalepensis</i> L.	ruda	hojas, tallos	San José de las Lajas/ Mayabeque
Myrtaceae	<i>Melaleuca quinquenervia</i> (Cav) S.T. Blake	melaleuca	hojas	Ciénaga de Zapata/ Matanzas

difusión en agar, según la técnica estandarizada por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (8), basada en el método de Kirby-Bauer. En cada placa se colocaron cuatro discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro; a dos de los discos se les añadió 10 µl del aceite esencial y los otros dos se emplearon como controles negativos. Como control positivo se utilizaron discos impregnados con Estreptomocina (30 µg.disco<sup>-1</sup>) (OXOID).

La evaluación se realizó por cuatuplicado para cada tratamiento. Los resultados de las diferentes dosis evaluadas se compararon a través de un análisis de varianza, empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan y el paquete estadístico SAS 9.0.

Las placas se incubaron a 28°C durante 24h. Una vez transcurrido este tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición (dhi) del crecimiento bacteriano. La actividad de los aceites se clasificó en marcada (dhi ≥16mm), moderada (12mm ≤ dhi < 16mm), ligera (8 mm ≤ dhi < 12mm) o sin actividad (dhi < 8 mm), según los rangos de la escala utilizada por Sánchez *et al.* (9).

Para evaluar la sensibilidad de la bacteria fitopatógena frente al compuesto mayoritario del aceite esencial más promisorio, este se disolvió en hexano y se preparó a una concentración de 0,2%. En la evaluación de la sensibilidad se procedió de igual forma a la descrita anteriormente para los aceites. Se emplearon, como controles negativos, discos a los que se añadió 10 µl de hexano (Merck).

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se empleó el método de las diluciones seriadas (10) en medio de cultivo Hugh Leifson (O/F Hugh Leifson) líquido, preparado a partir de sus componentes. Al medio se le adicionó DMSO (1,25%, Merck) para facilitar la solubilización del aceite más promisorio y su compuesto mayoritario.

Las concentraciones evaluadas fueron 0,4% (8 µl de aceite esencial en 2 ml de medio); 0,2%; 0,1%; 0,05% y 0,025% y de cada una se realizaron 5 réplicas. Se incluyeron dos controles de crecimiento bacteriano con y sin DMSO. Los tubos con las diluciones de los aceites se inocularon con 100 µl de la suspensión de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>). Se incubaron a 28°C y, después de 24h, se determinó la CMI del crecimiento de la bacteria. La CMI se tomó como la concentración más baja del tratamiento (aceite y su compuesto mayoritario) que inhibió el crecimiento visible del microorganismo después de la incubación.

En aquellos casos donde se observó inhibición, se tomaron 100 µl y se sembró en tubos que contenían el medio específico Hugh Leifson (O/F Hugh Leifson) libre del agente antimicrobiano. La más baja concentración de la muestra, capaz de producir daño letal en la célula microbiana, se definió como la CMB.

La composición química del aceite bioactivo se determinó en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent6890, 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=0.10mm) con una inyección de 2 ml. Se usó Helio como gas portador, y la identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275 y el Atlas Registry of Mass Spectra Data.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aceites evaluados solo el de tomillo produjo inhibición total del crecimiento (Tabla 2), por lo que resultó el aceite de mayor actividad antibacteriana. Esta esencia mostró un efecto superior al del antibiótico utilizado como control; su actividad se clasificó como marcada, mientras que la del antibiótico fue moderada, por tanto, el aceite se consideró promisorio. Los aceites de anís y albahaca produjeron halos de inhibición alrededor del disco, pero la actividad fue clasificada como ligera. Las esencias de naranja dulce, cúrcuma, ruda y melaleuca no inhibieron el crecimiento de la bacteria fitopatógena.

**TABLA 2.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* /Antibacterial activity of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Tratamiento	Halo de inhibición (mm, clasificación)
Aceite esencial de <i>T. vulgaris</i>	90,0 a
Aceite esencial de <i>P. anisum</i>	8,0 c
Aceite esencial de <i>C. sinensis</i>	N.I c
Aceite esencial de <i>O. basilicum</i>	8,0 c
Aceite esencial de <i>C. longa</i>	N.I c
Aceite esencial de <i>R. chalepensis</i>	N.I c
Aceite esencial de <i>M. quinquenervia</i>	N.I c
Estreptomocina (Control)	13 b

N.I: No inhibición

\*Para cada aceite esencial letras distintas indican diferencias significativas (p≤0,05).

La bacteria evaluada no fue sensible a los aceites de anís, albahaca, melaleuca, ruda y cúrcuma; sin embargo, la actividad de estos sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Doidge (Dye), *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (Davis et

al.) se informó previamente por otros autores (11, 12, 13). Otros microorganismos fitopatógenos como *Alternaria solani* Sorauer y *Fusarium* sp., también fueron susceptibles a estas esencias (14, 15).

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* se evaluó anteriormente frente a aceites esenciales de diferentes géneros y especies de plantas aromáticas, dentro de los cuales se destacó el aceite de *T. vulgaris* por su fuerte actividad antibacteriana (4). Nuestros resultados corroboran este efecto para el aceite obtenido a partir de la materia prima recolectada en Cuba. Sin embargo, en estos estudios previos no se menciona la composición química de la esencia, lo cual es muy importante para garantizar la reproducibilidad de los resultados. La actividad biológica de un aceite esencial puede variar en dependencia de la composición química del mismo, unido a esto, los altos niveles de inhibición provocados por el aceite de tomillo condujeron a profundizar en su estudio químico y biológico.

En el aceite de tomillo se identificaron 27 compuestos con más de 0,1% de abundancia relativa (Tabla 3). En la composición química del aceite predominaron los monoterpenos (59,26%) y los sesquiterpenos (29,63%), y en ambos grupos se identificaron compuestos oxigenados.

Los constituyentes principales identificados en la mezcla fueron: timol (56,98%), su precursor biosintético p-cimeno (14,67%) y  $\gamma$ -terpineno (14,13%) (Figura). Previamente, estos compuestos se identificaron como mayoritarios en otros aceites de tomillo (16, 17). De los varios quimiotipos de *T. vulgaris*, el aceite estudiado corresponde al de timol, por contener más del 50% de este compuesto (16).

En la mezcla analizada se encontraron con más de 1% de abundancia relativa:  $\alpha$ -terpineno (1,65%), L-linalol (1,64%),  $\alpha$ -tujeno (1,52%), mirceno (1,38%) y carvacrol (1,33%); compuestos muy frecuentes en la esencia de *T. vulgaris* (17, 18, 19). El resto de los componentes identificados contribuyen a la composición del aceite con un porcentaje menor a este; sin embargo, algunos de ellos se informaron en mayor abundancia relativa en muestras de otros orígenes geográficos, analizadas previamente. Imelouane et al. (18) informaron alcanfor (38.54%), canfeno (17,19%),  $\alpha$ -pineno (9,35%), borneol (4,91%) y  $\gamma$ -pineno (3,90%) como compuestos mayoritarios de su esencia. En el aceite esencial, obtenido a partir de hojas de *T. vulgaris* por Kazemi et al. (20), se identificaron  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, alcanfor, timol y carvacrol como los componentes más abundantes.

Las diferencias en cuanto a la abundancia de cada componente de la esencia, con respecto a las infor-

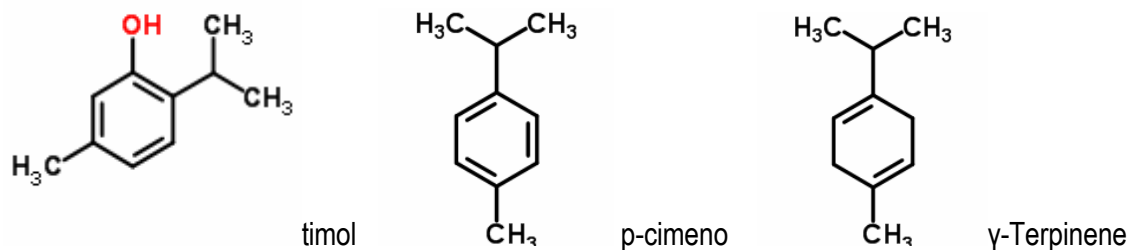


**TABLA 3.** Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L./ *Chemical composition of essential oil of Thymus vulgaris* L.

Pico	t <sub>r</sub> (min)	Abundancia relativa (%)*	Identificación
1	2,70	1,52	α-tujeno
2	2,82	0,75	α-pineno
3	3,07	0,37	canfeno
4	3,61	0,27	β-pineno
5	3,73	0,97	1-octen-3-ol
6	3,97	1,38	mircenol
7	4,22	0,18	α-felandreno
9	4,53	1,65	α-terpineno
<b>10</b>	<b>4,80</b>	<b>14,67</b>	<b>p-cimeno</b>
<b>11</b>	<b>5,70</b>	<b>14,13</b>	<b>γ-terpineno</b>
12	6,37	0,12	terpinoleno
13	6,80	1,64	L-linalol
14	8,36	0,20	(-)-alcanfor
15	8,58	0,59	L-borneol
16	8,95	0,87	terpinen-4-ol
17	9,83	0,10	(-)-α-terpineol
18	11,06	0,19	eter metil carvacrol
<b>19</b>	<b>13,09</b>	<b>56,98</b>	<b>timol</b>
20	15,16	1,33	carvacrol
21	15,70	0,12	β-cariofileno
22	16,13	0,50	α-humeleno
23	16,63	0,20	d-germacreno
24	16,77	0,12	α-amorfeno
25	17,55	0,31	δ-cadineno
26	18,01	0,16	óxido de cariofileno
27	18,28	0,42	10-epi-γ-eudesmol
28	18,45	0,10	epibiciclosesquifelandreno

t<sub>r</sub> (tiempo de retención).

\*se presenta la identificación de los compuestos presentes en el aceite con una abundancia relativa mayor que 0.1%.



**FIGURA.** Componentes principales del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L./ *Main components of Thymus vulgaris* essential oil.

madas por otros autores, acentúan la gran variabilidad que presenta la composición química de la esencia de tomillo y la importancia de determinar la composición química que corresponde a determinado efecto biológico. Estas variaciones pueden estar asociadas a las condiciones medio ambientales, especie, estado fenológico de la planta, parte de la planta que se utilice

para extraer la esencia, tiempo de cosecha, método de extracción, del tiempo de extracción del aceite, entre otros (18).

La actividad antibacteriana es frecuentemente correlacionada con la composición química de los aceites esenciales, y en numerosos estudios se plantea

que la mayor contribución al efecto antimicrobiano la ejercen sus componentes oxigenados (21). En la esencia de tomillo estudiada, estos compuestos oxigenados representan el 40,7% de los compuestos identificados y, dentro de ellos, el timol aportó más del 50%. En estudios previos, la acción bactericida de timol se demostró y se comparó con otros componentes de aceites esenciales, y de todos los compuestos evaluados fue el que produjo mayor inhibición frente a todas las cepas (22). Consecuentemente, por su contribución cuantitativa a la composición de la esencia bioactiva y antecedentes de actividad biológica, se seleccionó este terpeno para evaluaciones encaminadas a definir si podría asociarse su presencia al efecto antibiótico sobre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

El timol provocó una inhibición marcada (halo de inhibición=27mm) del crecimiento de *P. carotovora* subsp. *carotovora*; mientras que el hexano utilizado como control no inhibió el desarrollo bacteriano. Por tanto, se confirmó que este compuesto contribuye al efecto producido por el aceite de tomillo estudiado sobre el agente causal de la pudrición blanda.

Los valores de CMI y CMB del aceite fueron iguales a 0,1% y para el timol a 0,2%; se observa coincidencia en los resultados obtenidos para las réplicas evaluadas. Estos resultados corroboraron la elevada actividad del aceite y su componente mayoritario sobre la bacteria fitopatógena evaluada. Sin embargo, los valores de CMI y CMB del timol fueron mayores que los de la esencia y esto puede indicar la existencia de un efecto sinérgico entre los compuestos de la mezcla que la hacen más activa. Entre los componentes identificados en el aceite, existen precedentes del efecto sinérgico del carvacrol y el timol (23), aunque la determinación precisa de la contribución de cada componente debe abordarse en investigaciones futuras.

La actividad antibacteriana del timol y otros monoterpenos está relacionada a daños estructurales y funcionales que provocan en la fracción lipídica de la membrana plasmática. Estos interactúan con proteínas de membrana y dianas intracelulares, inducen alteraciones en la permeabilidad de la membrana, despolarización y liberación de material intracelular de las bacterias (24). Horvath *et al.* (25) demostraron la capacidad del aceite esencial de tomillo para cambiar cuantitativamente el perfil de proteínas de membrana de cepas de *Erwinia* spp.; estos cambios pudieran explicar el efecto antibacteriano del aceite. Los resultados obtenidos señalan al aceite de tomillo como ingrediente activo promisorio para el desarrollo de nuevos plaguicidas destinados al manejo de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en cultivos de importancia económica.

## REFERENCIAS

1. Millan S. Potato (*Solanum tuberosum* L.). Methods Mol Biol. 2006;344:25-36.
2. Hibar K, Daami-Remadi M, El Mahjoub M. Primeiro relato de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em plantas de tomateiro na Tunísia. Tunísia Journal of Plant Protecção. 2007;2:1-5.
3. Franco Cardoza Yuliet, Stefanova Nalimova Marusia. Determinación de actividades enzimáticas implicadas en la virulencia de cepas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* aisladas de papa. Agro Sur. 2008;36(3):130-136.
4. Alamshahi L, Hosseini Nezhad M, Panjehkeh N, Sabbagh SK, Sadri S. Antibacterial Effects of Some Essential Oils on the Growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. The 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 2010: 170-176.
5. Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Protection. 2010;29:913-920.
6. Samara de Lira Mota Kelly, de Oliveira Pereira F, Araújo de Oliveira W, Oliveira Lima Igara, de Oliveira Lima Edeltrudes. Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and Its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. Molecules. 2012;17:14418-14433.
7. International Standardization Organization. ISO 6571. Spices, condiments and herbs- Determination of volatile oil content. 1984; (Norma ISO).
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 1997;17:234-238.
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. Ababouch L, Bouqartacha F, Busta FF. Inhibition of *B. cereus* by fatty acids and monolaurin. Food Microbiol. 1994;11:327-336.
11. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Rodríguez H, Abreu Y, Duarte Y, *et al.* Composición química y actividad

- plaguicida del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake. Rev Protección Veg. 2011;26(3):177-186.
12. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM, Abreu Y, Correa TM. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Pimpinella anisum* L. Rev Protección Veg. 2012;27(3):181-187.
  13. Rojas MM, Sánchez Y, Abreu Y, Espinosa I, Correa TM, Oriela P. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. Rev Protección Veg. 2012;27(2):130-134.
  14. Bautista CV. Assay of the Different Concentration of Round Turmeric (*Curcuma Longa* Linn.) Extract in the Management of Diseases of Organically Grown Pepper (*Capsicum Annuum* Lin.). International Journal of Plant Ecology. 2013;1:28-43.
  15. Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso MC, Martínez B. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. Rev Protección Veg. 2013;28(1):54-59.
  16. Marzec M, Polakowski C, Chilczuk R, Ko<sup>3</sup>odziej B. Evaluation of essential oil content, its chemical composition and price of thyme (*Thymus vulgaris* L.) raw material available in Poland. Herba Polonica. 2010;56(3):37-52.
  17. Shabnum S, Wagay MG. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. Journal of Research & Development. 2011;11:83-94.
  18. Imelouane B, Amhamdi H, Wathelet JP, Ankit M, Khedid K, El Bachiri A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.) from eastern Morocco. J Agric Biol. 2009;11:205-208.
  19. Hemada M, El-Darier S. Comparative study on composition and biological activity of essential oils of two *Thymus* species grown in Egypt. Am-Euras. J Agric & Environ Sci. 2011;11(5):647-654.
  20. Kazemi M, Mousavi E, Bandrez N. Chemical Compositions and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Tanacetum parthenium*. Research Journal of Soil Biology. 2012;4(2):21-31.
  21. Maguna FP, Romero AM, Garro OA, Okulik NB. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias, UNNE, Argentina. 2006.
  22. Karami-Osboo R, Khodaverdi M, Ali-Akbari F. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural Science and Technology. 2010;12(1):35-45.
  23. Fuselli SR, García de la Rosa SB, Gende LB, Eguaras MJ, Fritz R. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Revista Argentina de Microbiología. 2006;38:89-92.
  24. Hyldgaard M, Mygind Tina, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol. 2012;25(3):12.
  25. Horváth G, Kovács Krisztina, Kocsis Béla, Kustos I. Efeito de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Óleo Essencial e seus principais constituintes na Outer Membrane Protein Composição de *Erwinia* cepas estudadas com a tecnologia Chip Microfluid. Chromatographia. 2009;70(11-12):1645-1650.

Recibido: 6-10-2014.

Aceptado: 7-11-2014.