

Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia

Luz Stella Ramírez^{1,*}, José Hipólito Isaza¹, Luz Ángela Veloza¹,
Elena Stashenko² y Darwin Marín¹

¹Grupo polifenoles, UTP-Cenivam. Pereira, Colombia. ²Cibimol Cenivam. Santander, Colombia.

Recibido: 11-05-09 Aceptado 09-11-09

Resumen

A partir de las partes aéreas de plantas de *Lippia origanoides* crecidas en diferentes regiones de Colombia, se obtuvieron nueve aceites esenciales por hidrodestilación asistida por radiación de microondas y analizados por GC-MS. La actividad antibacteriana de los aceites fue evaluada por el método de perforación en placa de agar y la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada por el método de microdilución en caldo. Los rangos de inhibición frente a los microorganismos evaluados estuvieron entre 14 y 105% con respecto a los antibióticos control, y las MIC entre 256 y 1024 ppm. Estos resultados indican que los aceites de *Lippia origanoides* pueden ser útiles en el desarrollo de compuestos antibacterianos.

Palabras clave: *Lippia origanoides*, aceites esenciales, actividad antibacteriana.

Antibacterial activity of *Lippia origanoides* essential oils from different Colombian regions

Abstract

Starting from the aerial parts of *Lippia origanoides* plants, grown in different Colombian regions, nine essential oils from were obtained through hydro-distillation assisted by microwave radiation and analyzed by GC-MS. The oils antibacterial activity was evaluated using the agar-well diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution. The inhibition ranges against the evaluated microorganisms were between 14 and 105% regarding to the antibiotics control, and the MIC between 256 and 1024 ppm. These results indicate that the oils from *Lippia origanoides* could be useful in the development of antibacterial compounds.

Key words: *Lippia origanoides*, essential oils, antibacterial activity.

Introducción

Los aceites esenciales, son líquidos aromáticos obtenidos de diferentes partes de las plantas y utilizados ampliamente como saborizantes y en la industria de los

perfumes (1). Se ha demostrado que algunos aceites poseen actividades antibacteriana, antifúngica, antiviral (2), insecticida, antitóxica (3) y propiedades antioxidantes (4), otros aceites han sido usados en el tratamiento de cáncer (5).

* Autor para la correspondencia: luramire@utp.edu.co

Las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales y sus componentes son utilizadas en diversos productos comerciales tales como selladores dentales de canal radicular (6), antisépticos (7, 8) y suplementos alimenticios para cerdas lactantes y lechones destetados (9, 10). Algunos conservantes que contienen aceites esenciales ya están disponibles comercialmente, para su uso en la industria de alimentos (11).

Las enfermedades producidas por enterobacterias (*Escherichia* y *Salmonella*) generalmente están asociadas con la ingesta de alimentos contaminados; las enterobacterias causan gastroenteritis y diarrea siendo responsables de tasas de mortalidad altas, con más de 50000 muertes diarias, como consecuencia de estas infecciones (12, 13). El surgimiento de cepas resistentes a antibióticos se ha convertido en un serio problema de salud y ha obligado a la búsqueda de nuevas fuentes de éstos, encontrándose en los aceites esenciales un alto potencial para ello.

Las plantas del género *Lippia* (*Verbenaceae*) han sido utilizadas para propósitos medicinales en muchos países, varias actividades biológicas tales como antibacteriana, antiparasitaria, antiviral y antimicótica han sido establecidas tanto para los extractos como para los aceites (14).

Lippia origanoides HBK es un arbusto aromático, que crece hasta 1,7 m de altura perteneciente a la familia Verbenaceae. Es conocido como "alecrim do Campo" y se ha propagado ampliamente en el estado de Piauí (Brasil), donde es utilizado comúnmente en la medicina tradicional para el tratamiento de la influenza, resfriados e infecciones pulmonares. También se ha usado en Venezuela como tónico contra el dolor de estómago, como remedio contra el resfriado, la gripe, bronquitis y asma (14, 15), algunas especies se han usado contra la diarrea y la disentería. En África especies de *Lippia* sp. se usan contra la malaria (16).

Compuestos biológicamente activos que proceden de fuentes naturales han sido siempre de gran interés para los científicos que trabajan en enfermedades infecciosas. En los últimos años, ha habido un creciente interés en la evaluación de las plantas que poseen actividad antibacteriana contra diversas enfermedades (17), por lo que el objeto de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de los aceites de *Lippia origanoides* obtenidos de especies de diferentes regiones de Colombia.

Materiales y métodos

Material vegetal

Nueve muestras de hojas de *Lippia origanoides* fueron colectadas en diferentes re-

Tabla 1
Origen geográfico y voucher de muestras de *Lippia origanoides* empleadas para obtener los aceites esenciales estudiados

Voucher N ° (COL)	Localidad	Departamento
517741	Soatá	Boyacá
512271	Jordán Sube	Santander
520285	Pedregal	Nariño
512075	Bucaramanga	Santander
512087	Mercaderes	Cauca
519798	Bucaramanga	Santander
519799	Bucaramanga	Santander

giones de Colombia, tres de ellas corresponden a la misma identificación taxonómica (517741), pero recolectadas en diferentes épocas del año. La clasificación de las especies fue desarrollada en el Herbario Nacional de Colombia, los números de Voucher N° (COL) y las regiones aparecen referenciados en la tabla 1.

Extracción del aceite esencial

Los aceites esenciales fueron extraídos a partir de hojas secas, a través de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, según la metodología descrita por Stashenko *et al.* (18). Los aceites esenciales decantados fueron secados con sulfato de sodio.

Análisis cromatográfico

La caracterización química de los aceites esenciales se desarrolló, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), en un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, con analizador cuadrupolar, en una columna DB-5MS, con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(dimetilsiloxano), (60 m de largo × 0,25 mm de diámetro × 0,25 μm de película). La identificación de los compuestos fue basada en los índices de Kovats, espectros de masas, comparación entre las muestras, los estándares y las bases de datos.

Actividad antibacteriana

Microorganismos. Las bacterias utilizadas fueron *Salmonella tiphymurium* ATCC (American type culture collection) 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y unos aislamientos de *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* N° 1 resistente a amoxicilina, y *Escherichia coli* N° 2 sensible a amoxicilina.

Prueba de actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana fue evaluada utilizando el método de perforación en pla-

ca, adicionando en los pozos un volumen de 20 μL de aceite e incubando por 24 horas a 37°C. Se realizaron 3 réplicas de cada uno de los ensayos, se midió el halo de inhibición, y se comparó con el control positivo para determinar el porcentaje de inhibición. Los controles utilizados fueron Ampicilina (*P. aeruginosa*), Amoxicilina (*S. gallinarum*, *S. tiphymurium* *E. coli* N° 2, *B. cereus*, *S. aureus*) y Trimetropin sulfato para *Escherichia coli* N° 1. Los resultados presentados son el promedio de 3 repeticiones.

La MIC (Concentración mínima inhibitoria), definida como la concentración más baja del aceite que inhibe el 100% del crecimiento bacteriano, fue determinada utilizando la técnica de microdilución en caldo, empleando cajas de 96 pozos. Se realizaron diluciones dobles del aceite desde una concentración de 1024 hasta 1 ppm. Se incubó durante 4 horas a 37°C y se adicionó Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT); el color violeta indica crecimiento bacteriano, y el color amarillo indica inhibición. Los pozos que dieron un color amarillo se confirmaron por siembra en placa y se determinó la Mínima concentración bactericida (MBC).

Resultados y discusión

La tabla 2 muestra los porcentajes de inhibición y las concentraciones de los aceites de *Lippia origanoides* utilizadas por el método de perforación en placa. Los porcentajes de inhibición variaron de 14 a 105 %, con respecto al antibiótico control.

Como se observa en los resultados de la tabla 2 el microorganismo más resistente a la acción de los diferentes aceites fue *P. aeruginosa*, resultado que coincide con reportes de alta resistencia de éste a muchos antibióticos (19) y también a algunos aceites esenciales como el de Eucalipto (20, 21).

Los aceites que dieron halos de inhibición de más de 40% comparado con el antibiótico (Ampicilina 25 μg/μL) frente a este microorganismo, son los que presentan los

Tabla 2
 Porcentajes de inhibición* de cepas bacterianas y concentración de los aceites de *Lippia origanoides*

Microorganismos	Conc. (µg/µL)	Aceites Esenciales de <i>Lippia origanoides</i>									
		512271	512087	512075	520285	517741	517741	517741	517741	519798	519799
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 (GN)	100	43,2	44	46,7	58,3	47,2	43,1	47,2	46,3	48,5	
	50	28,4	29,3	40	50	41,7	37,5	38,9	34,3	39,4	
	25	24,3	16	33,3	43,3	36,1	31,9	33,3	26,9	31,8	
<i>Salmonella gallinarum</i> (GN)	100	77	53,3	42,9	53	55,8	53,3	58,7	56,7	53	
	50	50,8	46,7	34,3	39,4	45,5	44	46,7	38,8	42,4	
	25	42,6	30,7	30	34,8	37,7	33,3	38,7	32,8	36,4	
<i>Escherichia coli</i> N°1 (GN) (Resistente a amoxicilina)	100	63,2	70,2	66,7	69,4	68,2	56,1	50	61,7	66,1	
	50	50,9	54,4	52,1	51,6	40,9	40,9	42,4	38,3	45,8	
	25	38,6	47,4	35,4	41,9	31,8	33,3	37,9	30	40,7	
<i>Escherichia coli</i> N° 2 (GN)	100	54,9	50	59,2	51,5	59,2	52,1	57,7	57,1	58,7	
	50	45,1	37,8	43,4	44,1	53,5	40,8	49,3	46	47,6	
	25	36,6	31,1	34,2	38,2	42,3	35,2	42,3	36,5	36,5	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (GN)	100	62,1	-	42,3	-	-	-	25	-	-	
	50	51,7	-	-	-	-	-	-	-	-	
	25	29,3	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (GP)	100	54,7	63,2	40,8	50	104,9	102,4	104,9	66,7	54,4	
	50	37,3	52,9	30,3	34,8	80,5	76,2	80,5	52,6	42,1	
	25	25,3	41,2	-	10,6	68,3	64,3	61	42,1	33,3	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (GP)	100	42,3	43,1	47,1	42,3	78,9	76,4	81,8	65,2	55,7	
	50	36,6	37,5	41,4	33,8	52,6	52,7	69,1	43,5	41,4	
	25	33,8	30,6	34,3	26,8	36,8	-	49,1	30,4	25,7	

* Técnica: Perforación en placa de agar. - = No inhibe al microorganismo estudiado. GP = Gram positivo. GN = Gram negativo.

mayores porcentajes de carvacrol, (512271 y 512075). Estos resultados coinciden con trabajos previos (22) quienes encontraron mayores halos de inhibición del carvacrol para *P. aeruginosa*, que del timol, cuando evaluaron estos compuestos en forma independiente. También se reporta que *P. aeruginosa* es más resistente a la acción del timol y el carvacrol que *S. aureus* (23).

Lo anterior se puede explicar en términos de la importancia de la posición del grupo hidroxilo en la estructura fenólica que puede variar la efectividad del carvacrol y el timol como agentes antimicrobianos.

Todos los aceites presentaron actividad inhibitoria a las tres concentraciones evaluadas, frente a microorganismos Gram negativos, exceptuando *P. aeruginosa*; y frente a los microorganismos Gram positivos la mayoría presentaron actividad, excepto los aceites 512075 y 517741 a la concentración de 25 ppm frente a *S. aureus* y *B. cereus* respectivamente. Lo anterior indica una mayor sensibilidad de las bacterias Gram negativas que de las Gram positivas a este tipo de aceites. Tanto para las bacterias Gram positivas como para las Gram negativas se observa una dependencia de la inhibición con la concentración del aceite empleada (tabla 2). El mecanismo de acción de los aceites frente a los microorganismos Gram negativos es la desintegración de la membrana externa de este grupo de bacterias, liberando los lipopolisacáridos, e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (1).

A las diferentes concentraciones evaluadas todos los aceites presentaron algún grado de actividad inhibitoria frente a las cepas de *Salmonella* y *E. coli*; generalmente, los aceites esenciales que poseen propiedades antibacterianas fuertes contra agentes patógenos alimenticios, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol y timol (22-27). Lo cual coincide con la composición química de los aceites evaluados, representados en la tabla 3.

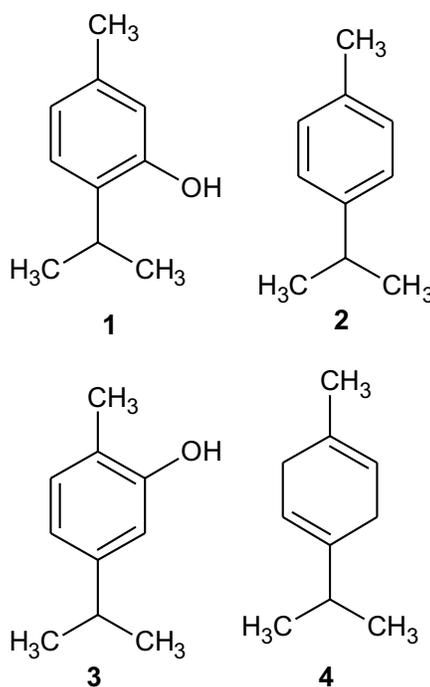


Figura 1. Fórmula estructural de algunos componentes de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*: 1. Timol, 2. *p*-Cimeno 3. Carvacrol 4. γ -Terpineno.

Parece razonable que su mecanismo de acción pueda ser similar al de otros fenoles; estos mecanismos incluyen la alteración de la membrana citoplasmática, perturbación de la fuerza motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de contenidos celulares (1, 28-30).

En la tabla 4 se observa que el aceite identificado como 519798, presenta valores bajos de MIC frente a 7 de los microorganismos evaluados, especialmente para *E. coli* sensible y resistente a amoxicilina lo anterior hace de este aceite un potencial candidato como agente bactericida. Si se analiza la composición química (Tabla 3) de este aceite se observa que a pesar de tener los porcentajes más bajos de timol y carvacrol (1,4 y 0,3, respectivamente), presentan los porcentajes más altos de *p*-cimeno y α -felandreno (14,6 y 10,3, respectivamente). Este aceite sólo tiene determinado el 36,1% de su

Tabla 3
Composición química de los aceites esenciales de *Lippia organoides*

Voucher N° (COL)	Rendimiento %	Componentes mayoritarios								Total
		Tim	Carv	<i>p</i> -Cim	<i>t</i> - β -Car	α -Fel	β -Fel	γ -Terp	β -Mir	
517741	4,4	59,7	12,2	8,8	1,8	0,1	0,3	4,5	2,2	89,6
517741	2,3	43,8	17,3	12,1	2,2	0,1	0,4	6,2	3,0	85,1
517741	1,6	74,4	10,4	2,7	0,4	0,0	0,0	0,3	0,3	88,5
512271	3,6	9,2	36,5	13,9	1,6	0,7	1,7	3,7	3,2	70,5
520285	3,1	54,5	1,7	10,0	2,4	0,9	1,0	5,0	2,8	78,3
512075	1,5	15,1	38,8	11,5	2,6	0,4	0,5	12,6	3,0	84,5
512087	2,0	53,6	0,7	11,5	3,2	0,4	0,7	6,3	4,5	80,9
519798	0,4	1,4	0,3	14,6	5,8	10,3	0,0	2,1	1,6	36,1
519799	1,6	66,0	1,5	7,2	3,6	0,2	0,2	4,4	2,2	85,3

Tim = Timol. Carv = Carvacrol. *p*-Cim = *p*-Cimeno. *t*- β -Car = trans- β -Cariofileno. α -Fel = α -Felandreno. β -Fel = β -Felandreno. γ -Terp = γ -Terpineno. β -Mir = β -Mirceno.

Tabla 4
Concentraciones mínimas inhibitorias (ppm) de los aceites esenciales de *Lippia organoides* frente a los microorganismos estudiados

Voucher N° (COL)	Microorganismos						
	<i>S.</i> <i>tiphymurium</i>	<i>S.</i> <i>gallinarium</i>	<i>E. coli</i> N° 1 (Res. Amox)	<i>E. coli</i> N° 2	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>
512271	512	1024	1024	512	>1024	1024	512
512087	512	1024	1024	512	>1024	512	512
512075	512	>1024	>1024	512	>1024	>1024	512
520285	256	64	1024	1024	>1024	64	256
517741	1024	1024	1024	1024	>1024	512	1024
517741	1024	1024	1024	1024	>1024	512	1024
517741	512	512	1024	512	>1024	512	512
519798	512	512	256	256	>1024	256	512
519799	512	512	1024	512	>1024	512	512

Res. Amox = Resistente a Amoxicilina. Unidades de los valores: $\mu\text{g}/\text{mL}$ = ppm.

composición química. Posiblemente muchos de los compuestos minoritarios que participan en la actividad bactericida frente a *E. coli* no se identificaron. Además el precursor biológico del carvacrol, es el *p*-cimeno compuesto hidrofóbico que causa inflamación de la membrana citoplasmática en una mayor extensión que el carvacrol (1). Lo anterior puede explicar los bajos valores de MIC de este aceite.

Como se observa en la figura 2 el aceite 519798 presenta valores más bajos de MIC (256 ppm) que el 519799 frente a *E. coli*; los valores de MIC para el antibiótico control (ciprofloxacina) estuvieron en el rango de 8 ppm. El DMSO solvente en el que se diluyeron todos los aceites no presenta ningún efecto de inhibición sobre el crecimiento bacteriano.

En este trabajo los valores de MIC coincidieron con los valores de MBC, lo que demuestra la acción bactericida de estos aceites a las diferentes concentraciones.

En general los microorganismos que presentaron MIC superiores o iguales a 1024 ppm, para la mayoría de los aceites

fueron *P. aeruginosa* y *E. coli* N° 1, esto puede atribuirse a mecanismos de resistencia adquiridos en estos microorganismos.

De los 9 aceites analizados, 6 presentan como componente mayoritario el timol, lo cual coincide con estudios previos de aceites de *Lippia origanoides* analizadas en Brasil (31) con timol como componente mayoritario (20,6-38,4%).

Mientras que otros 2 de los 9, presentan como componente mayoritario el carvacrol, lo cual coincide con algunos reportes (32). Lo anterior sugiere que en la especie *Lippia origanoides* se encuentran varios quimiotipos, de la misma forma que sucede con *Lippia alba* (33, 34). Esas diferencias químicas pueden estar relacionadas a diferencias en los suelos, las condiciones climáticas, y a variaciones genéticas intraespecíficas.

Las actividades inhibitorias presentadas frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos puede deberse a la presencia de timol y carvacrol, los cuales fueron los componentes mayoritarios en 8 de los aceites estudiados. No obstante existen evidencias que los componentes minori-

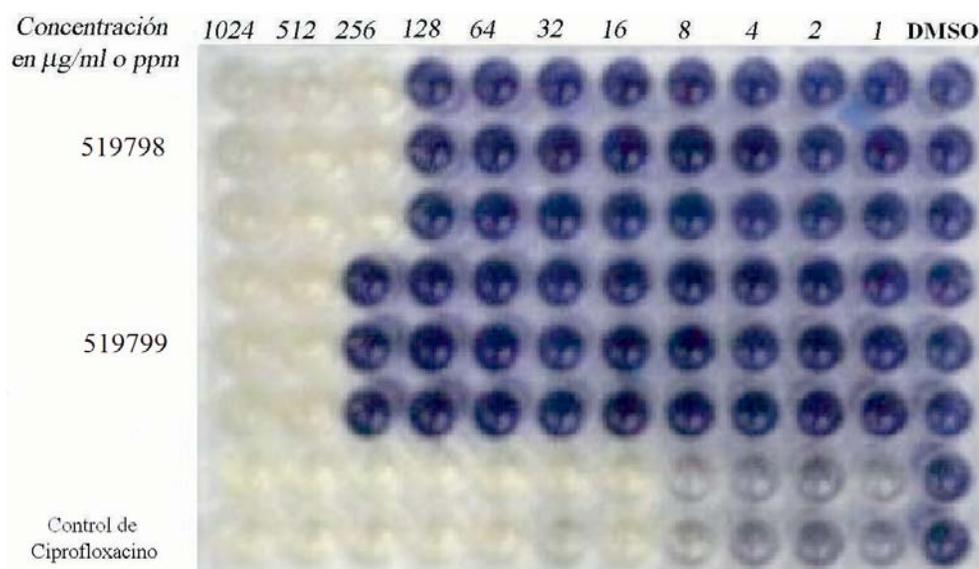


Figura 2. MIC de 256 y 512 µg/mL de los aceites esenciales 519798 y 519799 respectivamente, frente a *E. coli* N° 2.

tarios juegan un papel crítico en la actividad antibacteriana, posiblemente por producir un efecto sinérgico con otros componentes (35). La actividad antimicrobiana del carvacrol y el timol ha sido demostrada, ambos compuestos parece que afectan la permeabilidad de la membrana celular (36).

A pesar de la existencia de varios quimiotipos para diferentes especies de *Lippia organoides*, las cuales varían principalmente en el contenido de Carvacrol y Timol, en Europa son considerados mejores para la industria de alimentos los que tienen alto contenido de carvacrol (37-39). Así los aceites 512271 y 512075 provenientes de la región de Santander, los cuales muestran un alto contenido de Carvacrol (36,5 y 38,8% respectivamente), pueden ser considerados promisorios para futuras aplicaciones, principalmente en la industria de alimentos.

Conclusiones

Se observó una correlación entre la concentración de los aceites de *Lippia organoides* y los porcentajes de inhibición. El aceite 519798 presenta una MIC de 256 ppm frente a *E coli* resistente a amoxicilina, lo cual lo hace un potencial candidato para controlar infecciones producidas por este microorganismo. Los aceites 512271 y 512075 fueron los únicos que presentaron porcentajes de inhibición frente a *P. aeruginosa*, lo que los hace buenos candidatos como agentes antimicrobianos frente a este microorganismo que ha desarrollado varios mecanismos de resistencia.

En el análisis de composición química se encontró que de los 9 aceites evaluados 6 presentan como componente mayoritario el timol.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a Colciencias-Cenivam contrato RC 432 de 2004.

Referencias bibliográficas

- BURT S. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253. 2004.
- BISHOP C.D. *Journal of Essential Oil Research* 7: 641-644. 1995.
- AKGUL A., KIVANC M., SERT S. *Sciences des Aliments* 11: 361-370. 1991.
- KORDALI S., KOTAN R., MAVI A., CAKIRA., ALA A., YILDIRIM A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9452-9458. 2005.
- SYLVESTRE M., PICHETTE A., LONGTIN A., NAGAU F., LEGAULT J. *Journal of Ethnopharmacology* 103: 99-102. 2006.
- MANABE A., NAKAYAMA S., SAKAMOTO K. *Japanese Journal of Pharmacology* (44): 77-84. 1987.
- COX S.D., MANN C.M., MARKHAM J.L., BELL H.C., GUSTAFSON J.E., WARMINGTON J.R., WYLLIE S.G. *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175. 2000.
- BAUER K., GARBE D. Preparation, Properties and Uses, in: *Common Fragrance and Flavor Materials*. Weinheim (Germany). 213 pp. 1985.
- ILSLEY S., MILLER H., GREATHEAD H., KAMEL C. *Pig Progress* 18(4): 8-10. 2002.
- VAN KRIMPEN M.M., BINNENDIJK G.P. *Le-lystad, Praktijkonderzoek Veehouderij* May 2001 (ISSN 0169-3689). 14 p. 2001.
- MENDOZA Y.M.J., SANCHEZ H.L.E., MAERTENS G., MARIN I., F. *Journal of Food Safety* 17: 47-55. 1997.
- HUEBNER, R. R. E. W. A., MUSHI A. *Int. J. infect. dis.* 3: 18-25. 1998.
- LUTTERODT G.D. *Journal of Ethnopharmacology* 37: 151-157. 1992.
- PASCUAL M.E., SLOWING K., CARRETERO E., SANCHEZ M.D., VILLAR A. *Journal of Ethnopharmacology* 76: 201-214. 2001.
- MORTON. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield, Illinois (USA). 745-750. 1981.

16. VALENTIN A., PÉLISSIER Y., MARION F.B.C., KONE D., MALLIE M., BASTIDE J.M., BESSIÉRES J.M. *Phytochemistry* 40: 1439-1442. 1995.
17. CLARK A.M., HUFFORD C.D. Disco and development of novel prototype antibiotics for opportunistic infections related to the acquired Immunodeficiency syndrome, in: **Human Medical Agents from Plants**. Washington DC (USA). 228241. 1993.
18. STASHENKO E.E., JARAMILLO B.E., MARTÍNEZ J.R. *J. Chromatogr. A* 1025: 93-103. 2004.
19. GARCIA P. *Rev Chil Infect* 20(Supl 1): S11-S23. 2003.
20. KUMAR A., SHARMA V., SINGH A. *Fitoterapia* 198(2): 141-4.
21. DELLACASSA E., MENENDEZ P., MOYNA P.,P. C. *Fitoterapia* 6: 544-6. 1989.
22. DORMAN H.J.D., DEANS S.G. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316. 2000.
23. LAMBERT R.J.W., SKANDAMIS P.N., COOTE P., NYCHAS G.J.E. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462. 2001.
24. FARAG R.S., DAW Z.Y., HEWEDI F.M., ELBAROTY G.S.A. *Journal of Food Protection* 52(9): 665-667. 1989.
25. THOROSKI J., BLANK G., BILIADERIS C. *Journal of Food Protection* 52(6): 399-403. 1989.
26. COSENTINO S., TUBEROSO C.I.G., PISANO B., SATTÀ M., MASCIA V., ARZEDI E., PALMAS F. *Letters in Applied Microbiology* 29: 130-135. 1999.
27. JULIANO C., MATTANA A., USAI M. *Journal of Essential Oil Research* 12: 516-522. 2000.
28. DENYER S.P., HUGO W.B. Mechanisms of antibacterial action. A summary, in: **Mechanisms of Action of Chemical Biocides**. Oxford (England). 331-334. 1991b.
29. SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B. *Microbiological Reviews* 59(2): 201-222. 1995.
30. DAVIDSON P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in: **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington (USA). 520-556. 1997.
31. MORAIS A.A., MOURAU J.C., GOTTLIEB O.R., SILVA M.L., MARX M.C., MAIA J.G.C. *Acta Amazonica* 2: 45-46. 1972.
32. OLIVEIRA D.R., LEITÃO G.G., BIZZO H.R., LOPES D.S., ALVIANO D.S., ALVIANO C.S., LEITÃO S.G. *Food Chemistry* 101(1): 236-240. 2007.
33. MATOS F.J.A., MACHADO M.I.L., CRAVEIRO A.A., ALENCAR J.W. *Journal of essential oil research* 8(6): 695-698. 1996.
34. ZOGHBI M.D.G.B., ANDRADE E.H.A., S. SANTOS A., L. SILVA M.H., S. MAIA J.G. *Flavour and Fragrance Journal* 13(1): 47-48. 1998.
35. MARINO M., BERSANI C., COMI G. *Int J Food Microbiol* 67(3): 187-95. 2001.
36. SALGUEIRO L.R., CAVALEIRO C., GONÇALVES M.J.,A. P.D.C. *Planta Med.* 69(1): 80-83. 2003.
37. FLEISHER A., SNEER N. *Journal Science Food Agriculture* 33: 441-446. 1982.
38. LAWRENCE B.M. *Perfumer and Flavorist* 9: 41-51. 1984.
39. TUCKER A.O., MACIARELLO M.J. **Oregano: botany, chemistry, and cultivation**. Elsevier Science B.V. Amsterdam (Netherlands). 439-456. 1994.