

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE ORÉGANO (*Lippia graveolens* H.B.K.) Y
TOMILLO (*Thymus vulgaris* L) *in vitro***

POR

JUAN OROPEZA OROPEZA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE**

INGENIERO EN AGROECOLOGIA

TORREÓN, COAHUILA

MARZO DE 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO
(*Lippia graveolens* H.B.K.) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris* L) *in vitro***

TESIS

POR

JUAN OROPEZA OROPEZA

**ELABORADO BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE ASESORIA Y
APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**


INGENIERO EN AGROECOLOGIA

BIOL. GENOVEVA HERNANDEZ ZAMUDIO



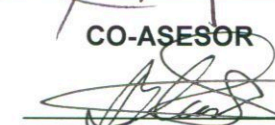
ASESOR PRINCIPAL

DR. JESUS VASQUEZ ARROYO



CO-ASESOR

M.C. EDUARDO BLANCO CONTRERAS



CO-ASESOR

M.Sc. EMILIO DUARTE AYALA



CO-ASESOR



**M.C. JOSE JAIME LOZANO GARCIA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas**

TORREÓN, COAHUILA

00061

MARZO DE 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TESIS

PRESENTA

JUAN OROPEZA OROPEZA

QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR

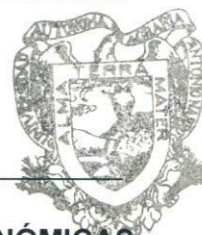

BIOL. GENOVEVA HERNANDEZ ZAMUDIO
PRESIDENTE


DR. JESUS VASQUEZ ARROYO
VOCAL


M.C. EDUARDO BLANCO CONTRERAS
VOCAL


M.Sc. EMILIO DUARTE AYALA
VOCAL SUPLENTE


M.C. JOSE JAIME LOZANO GARCIA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



Coordinación de la División
de Carreras Agronómicas

TORREÓN, COAHUILA

MARZO DE 2006

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna por brindarme la oportunidad de realizar en sus instalaciones mi carrera profesional.

Al departamento de Agroecología.

A la Biol. Genoveva Hernández Zamudio por su gran apoyo y estímulo constante para la realización de este trabajo de investigación.

Al M.C. Eduardo Blanco Contreras por su amistad y por sus constantes consejos.

Al Dr. Jesús Vásquez Arroyo por la revisión de este material por sus recomendaciones y sugerencias para ser cada día mejor.

Al M.Sc. Emilio Duarte Ayala por la revisión de este trabajo.

A todos los maestros que me impartieron clases durante mi estancia en esta institución por los conocimientos, sugerencias y anécdotas compartidos durante estos años.

A mis compañeros de generación: Luís Alberto, Gerli, Miguel Ángel, Gerardo, Orlando, Alfredo, Francisco Javier, Rubén Arturo y Gustavo.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron de manera indirecta para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis familiares.

A mis padres Perfecto Oropeza Claudio y Juana Oropeza Latín por su apoyo incondicional y por los buenos consejos para ser un ciudadano de bien.

A mis hermanos por los consejos, y animarme a terminar mis estudios de licenciatura.

A mis padrinos Juan Alejandrino Moyado Clemente y Maria del Rosario Castor García por sus apoyos y consejos cuando más los necesitaba.

A mi Alma Mater por las facilidades otorgadas para el logro de mi sueño que al principio me parecía imposible llegar.

INDICE GENERAL

PRESENTACION	i
APROBACION	ii
JURADO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDIATORIA	v
INDICE GENERAL	vi
INDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I.- INTRODUCCION	1
II.- OBJETIVOS	3
III.- REVISION DE LITERATURA	4
3.1 Aceites esenciales	4
3.2 Descripción de la especie de <i>Lippia graveolens</i> (H.B.K.).....	5
3.2.1 Distribución del orégano	5
3.2.2 Hábitat del orégano	6
3.2.3 Taxonomía del orégano.....	6
3.3 Taxonomía del Tomillo	6
3.4 Modo de acción de los aceites	7
3.4.1 Mecanismos de acción de los aceites	8
3.4.2.- Factores que afecta la bioactividad de los aceites esenciales ..	9
3.5.- Inocuidad alimentaría	10
3.6.- Bacterias	12
3.6.1 <i>Bacillus cereus</i>	12

3.6.2 <i>Escherichia coli</i>	12
3.6.3 <i>Pseudomona aureginosa</i>	13
3.6.4 <i>Staphylococos aureus</i>	13
3.6.5 <i>Salmonella typhimurium</i>	14
IV.- MATERIALES Y METODOS	15
4.1 Material vegetativo	15
4.2. Extracción del aceite esencial	15
4.3. Caracterización de los aceites esenciales	15
4.4. Cepas bacterianas	16
4.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	16
V.- RESULTADOS	17
5.1. Caracterización del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	17
5.1.1. <i>Lippia graveolens</i>	17
5.1.2. <i>Thymus vulgaris</i>	17
5.2. Actividad antibacteriana	18
VI.- DISCUSION	19
6.1. Caracterización de los aceites esenciales	19
6.1.1. - <i>Lippia graveolens</i>	19
6.1.2.- <i>Thymus vulgaris</i>	19
6.1.3.- CMI del Aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i>	20
6.1.4.- CMI del Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	20
VII.- CONCLUSION	21
VIII.- REFERENCIAS	22

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes del aceite esencial de <i>Lippia graveolen</i>	17
Cuadro 2. Componentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	17
Cuadro 3. Actividad antibacteriana de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> para cepas ATTCC.	18
Cuadro 4. Actividad antibacteriana de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> para cepas ATTCC.....	18

RESUMEN

El aceite de orégano (*Lippia graveolens* HBK) y el tomillo (*Thymus vulgaris* L) fueron utilizados para evaluar la actividad antibacteriana de ambas especies. Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas de las plantas, por hidrodestilación, durante 3 h usando un aparato tipo Rotavapor Buche R-220 modificado. La caracterización del aceite se realizó por cromatógrafo de gases. Las bacterias ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Escherichia coli* ATCC 25922, fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. La bacterias fueron inoculadas en 4 ml de caldo Mueller-Hinton en tubos de ensaye de 10 ml con diluciones de 19 a 0.29 $\mu\text{l/ml}$ de los aceite esencial de *L. graveolens* y *Thymus vulgaris* con diluciones 36 a 0.55 $\mu\text{l/ml}$ al 0.5% en etanol al 96 %, para reforzar la solubilidad. Los tubos fueron incubados a 35°C por 20 h. Los resultados obtenidos para el aceite esencial de *Lippia graveolens*, muestran que la bacteria con mayor sensibilidad fue *S. aureus* con 1.1 $\mu\text{l/ml}$ de CMI y la de mayor resistencia fue *Bacillus cereus* con 9.5 $\mu\text{l/ml}$ de CMI. En lo que respecta al aceite esencial de *Thymus vulgaris* las CMI se observan que la bacteria con mayor sensibilidad fue la *S. aureus* con 2.2 $\mu\text{l/ml}$ y las bacterias que mostraron mayor resistencia fueron *Bacillus cereus* y *Salmonella tiphymurium* 14028 con 18 $\mu\text{l/ml}$ de CMI. La posibilidad de utilizar en forma extensa el aceite esencial de *L. graveolens* para infecciones bacterianas requieren que se continúe con pruebas *in vitro* para otros grupos bacterianos y de hongos así como con pruebas en vivo para las bacterias que presentaron sensibilidad en la pruebas *in vitro*.

ABSTRACT

Oregano (*Lippia graveolens* HBK) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) were used in this research to evaluate the antibacterial activity potential from the oil extraction of both species. The essential oils were extracted from the plants canopy by the hidrodestilation processes during a period of 3 hours using an Rotavapor Crop Modified equipment. The experiment was conducted under *in vitro* conditions, using five different ATTC bacterias: *Staphylococcus aureus* 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Salmonella tiphymurium* 14028, *Bacillus cereus* 11778, and *Echerichia coli* 25922, which were provided by The Bacteriology Laboratory Cepario of the National School of Biological Sciences of the IPN. The bacterias were inoculated in 4 broth ml Mueller-Hinton in tubes of it rehearses of 10 ml with dilutions from 19 to 0.29 μ /ml of the essential oil of *L. graveolens* and *Thymus vulgaris* with dilutions 36 to 0.55 μ /ml to 0.5% in ethanol to 96%, to reinforce the solubility. According to the study results, *S. aureus* and were the most sensibility bacterias using the 1.1 μ /ml IMC. On the other hand, *S.aureus* was the most resistant bacteria using the 1.1 μ /ml IMC. Concerning to the *Thymus vulgaris* essential oil, *P. auroginosa* 27853 was the most sensibility bacteria using the 2.6720 μ /ml IMC. In contrast, *B. cereus* and *S. tiphymurium* 14028 were the most resistant bacterias using the 18 μ /ml IMC. Most studies in the oil extraction species, including oregano and thyme, conducted to evaluate bacterial infections have been run in laboratory condition, *in vitro*. Our study indicates, that more studies *in vitro* on other bacterial and fungi groups as well as with live tests for the bacterias that presented sensibility in the tests *in vitro*.

I.- INTORODUCCION

El efecto antimicrobiano de muchas hierbas y especias se ha conocido por años, y se usan para aumentar las vidas de anaquel de los alimentos. Existe evidencia en cultivos *in vitro* que indican que los aceites esenciales pueden actuar como agentes antimicrobianos contra una amplia gama de bacterias (Bergonzelli et al., 2003).

Durante años se ha conocido la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aislados de muchas plantas, sólo recientemente tales propiedades han sido confirmadas. Los factores como son la fuente botánica, procedencia de la planta, tiempo de cosecha o fase de desarrollo, técnica de extracción, parte de la planta, material fresco o seco, los microorganismos en que se prueban y la metodología antimicrobiana usada son factores que influyen en la actividad antibacteriano y, por consiguiente, deben tomarse en cuenta siempre que se realicé un ensayo con aceites esenciales (Faleiro et al., 2003).

Los aceites esenciales (también llamados aceites volátiles o etéreos por Guenther, 1948) son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos del material de la planta (flores, brotes, semillas, hojas, ramitas, corteza, las hierbas, madera, frutas y raíces) (Burt, 2004).

Los aceites esenciales de las especies de *Lippia* también han mostrado una amplia actividad antibacteriana contra los microorganismos: *Lippia sidoides* Cham. muestra actividad inhibitoria contra *Escherichia coli*, *Straphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* y baja actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y contra algunos microorganismos que viven en la piel de los pies y las axilas (Pascual et al, 2001).

EL aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L) se obtiene de las partes aéreas (ramas, hojas), se ha demostrado que el aceite tiene un amplia actividad antimicrobiana y antioxidante (Tepe et al., 2004).

La utilización de un recurso natural de la región, el aceite esencial de orégano, para la solución de un problema de índole mundial, la descomposición de los alimentos utilizando los aceites esenciales de orégano requiere ser abordado. Por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivos la caracterización y la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de orégano.

II.- OBJETIVOS

- 1.- Caracterización del aceite esencial de Orégano (*Lippia graveolens* HBK).
- 2.- Caracterización del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris* L)
- 3.- Evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* HBK) en cultivo *in vitro*.
- 4.- Evaluar el efecto antibacteriana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L) en cultivo *in vitro*.

HIPOTESIS

Ho.- El aceite de orégano tiene efecto antibacteriano , en bacterias Gram + y Gram – en cultivo in vitro.

Ha.- El aceite de orégano no tiene efecto antibacteriano en bacterias Gram + y Gram – en cultivo in vitro.

III.- REVISION DE LITERATURA

3.1.-Aceites esenciales

Los aceites esenciales, son mezclas líquidas, volátiles (no dejan, a diferencia de los aceites grasos, mancha sobre el papel), de propiedades aromáticas, extraídos de las plantas. Se encuentran casi exclusivamente en las fanerógamas y en especial en algunas familias: rosáceas, labiadas, umbelíferas, lauráceas, etc. se extraen por métodos diversos, predominando el de arrastre con vapor de agua, la composición es muy diversa, pero casi todos sus componentes pertenecen al grupo de los terpenos (Fon-Quer, 1979).

Varios aceites esenciales producen efectos farmacológicos y demuestran propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenos. Otros son agentes biocidas contra un amplio rango de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas (Kalemba and Kunicka, 2003).

Se han publicado muchos artículos de la actividad biológica de aceites esenciales. Los datos, sin embargo, muestran discordancia. Pueden entenderse las razones para esta variabilidad si se toma en cuenta todos los factores que influyen en la composición química de los aceites, es decir, las condiciones climáticas, estacionales y geográficas, periodo de cosecha y técnica de la destilación, entre otros. El efecto de madurez de la planta en el momento de la producción del aceite y la existencia de diferencias quimiotípicas también puede afectar drásticamente esta composición (Lahlou, 2004).

Los aceites volátiles de las plantas generalmente se aíslan de plantas no maderables por métodos de la destilación, normalmente vapor o hidrodestilación, y son mezclas inconstantes de terpenoides; principalmente, monoterpenos [C10], sesquiterpenos [C15] y diterpenos [C20]; también puede estar presentes una variedad de hidrocarburos alifáticos de peso molecular bajos (lineales, ramificados, saturados y monosaturados),

ácidos, alcoholes, aldehídos, acíclicos o lactones (Dorman and Deans, 2000).

3.2.-Descripción de la especie Orégano *Lippia graveolens*

El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies están distribuidas principalmente a lo largo de los países de América del sur, Centroamérica y en los territorios del África Tropical (Pascual et al., 2001; Rastrelli et al., 1998; Stashenko et al., 2004).

Las plantas de este género se utilizan en forma de te o infusión por poseer propiedades curativas para distintos padecimientos que van desde infecciones respiratorias y digestivas, hipertensión arterial, antiespasmódicas. Hasta contra la malaria, sarna, pedunculosis y como desinfectante bucal (Abe et al., 2002; Bassolea et al., 2003; Stashenko et al., 2004; Valentao et al., 1999; Valentao et al., 2002a).

3.2.1- Distribución del *L. graveolens*

L. graveolens H.B.k. es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá y Colombia (Rastrelli et al., 1998; Salgueiro et al., 2003a).

La producción de orégano para fines comerciales es la del género *Lippia* cuyas especies más abundantes en México son *Lippia berlandieri* y *Lippia graveolens* HBK. Esta producción se aprovecha en los estados de Durango, Guanajuato, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas y Coahuila (Hernández-Zamudio et al., 2005).

Las áreas productoras de orégano más importantes de México son la región del noroeste formado por los estados de Chihuahua, Tamaulipas, Coahuila y Durango (Comarca Lagunera), con el más del 50% de las cuotas

autorizadas, le siguen los estados de Jalisco, y Zacatecas así como Querétaro, Hidalgo, y Baja California Sur (Maldonado, 1991).

3.2.2.- Hábitat del *L. graveolens*

Se desarrolla en climas semiáridos y secos, desérticos muy calidos con presencia de lluvias en verano (Rzedosdowsky, 1978)

Las plantas de las diferentes familias de orégano mexicano se encuentran en estado silvestre, en regiones semiáridas de, al menos, 24 estados de la republica. Sus principales hábitat están en suelos generalmente pedregosos de cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 metros de altitud sobre el nivel de mar (msnm) aunque se le haya en mayor abundancia entre los 1400 y 1800 msnm (Huerta, 2002).

3.2.3.- Taxonomía del orégano

Entre las especies no maderables de las zonas áridas se establece que la especie de orégano (familia Verbenáceas) fue determinada por Kunth (*Lippia graveolens* Kunth), sinembargo, en el Herbario ANUL, Jorge S. Marroquín de la Fuente, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con base en la flora de Texas de I.M. Johnst, se establece que el autor es H.B.K. Ya que de acuerdo a las reglas taxonómicas si se trata de una reidentificación, debería describirse *L. graveolens* (H.B.K.) Kunth, (SEMARNAT-PROCYMAF, 2001).

3.3.- Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Existen más de 300 especies del genero *Thymus*, son plantas herbáceas perennes arbusto y subarbusto nativos de Europa del sur y Asia. El principal entre ellos, es *Thymus vulgaris* L. (tomillo o tomillo de jardín), una planta aromática muy conocida como planta medicinal, tiene una importancia creciente en la horticultura. Este género tiene una gran

reputación y otras propiedades farmacológicas, como antiespasmódico, expectorante, y rejuvenecedor. En la actualidad, el aceite esencial de *Thymus* es usado ampliamente como agentes para condimentar alimentos procesados y muchas preparaciones farmacológicas, y particularmente el aceite del tomillo está entre los 10 aceites esenciales que se encuentran en la cima del mundo. Los Informes acerca de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de muchos miembros del genero *Thymus* son numerosas en la literatura, y los aceites esenciales frecuentemente han permanecido como objeto central de muchos estudios (Tepe et al., 2004).

3.4.- Modo de acción de los aceites.

Se reporta que el polimorfismo químico que el timol tiene como precursor biogenético el γ -terpinene y el del carvacrol es el p -cymeno (Salgueiro et al., 2003a).

El carvacrol se ha caracterizado como un inhibidor de crecimiento de diferentes patógenos (Bagamboula et al., 2004). El aceite de orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Estas características son muy importantes para la industria alimentaría ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos así como también protegerlos contra alteraciones lipídicas (Olasupo et al, 2003).

El *B. cereus* frecuentemente se ha aislado de verduras frescas y alimentos preparados, basados en verduras. A las concentraciones sobre 1 μ l, disminuye la viabilidad de *B. cereus* exponencialmente. Al mismo tiempo, se observan aumentos en la fluidez de la membrana y escape de protones e iones de potasio lo que llevan a una disminución del pH de la membrana citoplasmática, esto lleva al colapso de la membrana y la inhibición de la síntesis de ATP. Finalmente, estos eventos son seguidos por muerte de la

célula (Ultee et al, 1999). La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hierbas y especias o sus componentes como timol, carvacrol, vanillin, etc. podrían ser el resultado de daño a los sistemas enzimáticos de la célula y podría incluir aquéllos asociados con la producción de energía y la síntesis de compuestos estructurales. Los fenoles podrían desnaturalizar las enzimas responsables de la germinación de la espora o podrían interferir con aminoácidos involucrados en la germinación. Varios estudios han intentado determinar la eficacia de extractos de las plantas seleccionadas como antimicrobianos y agentes antifungicidas (Lopez-Malo et al., 2005).

Los aceites volátiles de algunas coníferas también contienen carvacrol, se ha indicado que la actividad antioxidante de los aceites esenciales de las plantas antedichas es debido al carvacrol, y su isomero timol y algunos otros fenoles (Schwämmle et al., 2001).

Está aumentando el interés en el uso de compuestos antibacterianos derivados de planta como conservadores naturales de alimentos. Un ejemplo de este compuesto natural es el carvacrol que está presente en los fragmentos de aceite esenciales de orégano (60 a 70% carvacrol) y tomillo (45% carvacrol) (Ultee et al., 1999).

3.4.1.- Mecanismos de acción del carvacrol y timol.

El escape de iones esenciales durante la exposición a los compuestos antimicrobianos se observa a menudo en los microorganismos. Sin embargo, para muchos compuestos, el mecanismo fundamental de esta fuga no es conocido (Ultee et al., 1999).

Los fenoles podrían desnaturalizar las enzimas responsables de la germinación de la espora o podrían interferir con aminoácidos involucrados en la germinación. Varios estudios han intentado determinar la eficacia de

extractos de las plantas seleccionadas como agentes antimicrobianos (Lopez-Malo et al, 2005).

En el caso de *E. coli* O157:H7 existe una relación concentración/efecto a 625 ml/L con actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y 312 ml/L. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (Burt, 1999)

Se ha mostrado que la exposición de las células vegetativas al carvacrol en concentraciones de hasta 1 μ l conduce a una extensión de retraso del crecimiento (Ultee et al., 2002).

3.4.2.-Factores que afectan la bioactividad de los aceites esenciales.

Los volúmenes de aceites esenciales, en particular y los extractos de plantas medicinales que contienen actividad antimicrobiana, antioxidante y otras actividades biológicas pueden estar sujetos cambios, basado en las variaciones en la composición química de un aceite esencial que puede observarse debido al origen, la situación, las condiciones medioambientales, y la fase de desarrollo del de las plantas colectados. La actividad biológica de un aceite esencial se atribuye principalmente a sus componentes mayores, aunque el sinergismo o el efecto antagónico de un compuesto en un porcentaje menor de la mezcla tienen que ser considerados (Gulluce et al., 2003).

La prueba y evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es difícil debido a su volatilidad, insolubilidad al agua y complejidad. Las propiedades específicas de aceites esenciales requieren algunas modificaciones a los métodos que se han desarrollado para los agentes antimicrobiales solubles en agua. Los aceites esenciales son de naturaleza hidrófoba y de alta viscosidad. Estas propiedades pueden reducir la capacidad de la dilución o causa la distribución desigual del aceite a través del medio aun cuando un agente dispersor apropiado o un agente solubilizador sea usado (Kalemba and Kunicka, 2003).

En años recientes debido a muchos organismos causantes de infecciones resistentes a antibióticos, la búsqueda de un nuevo prototipo de medicamento para combatir estas infecciones es una necesidad absoluta y en esto considerando que los aceites esenciales de plantas pueden ofrecer un gran potencial y esperanza. Estos productos frecuentemente se han reportado por ser agentes antimicrobianos. El estudio de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales presenta alguna dificultad resumida como sigue:

Los aceites esencial tienen una composición química compleja; no son solubles en agua por sus componentes; algunos son volátiles; ellos deben usarse en dosis bajas (Lahlou, 2004).

Se han observado grandes variaciones en la composición de los aceites esenciales de *L. alba*, dependiendo de la parte de la planta que se emplea para la destilación, el estado de desarrollo de está, la situación geográfica, las características del suelo, el clima, y otras condiciones locales (Stashenko et al., 2004).

3.5.- Inocuidad alimentaría

Durante la última década, el aumento en infecciones causados por alimentos se ha vuelto una preocupación de salud pública según un informe de la

Organización Mundial de Salud, ciento de millones de personas de todo el mundo padeció enfermedades causadas por comida contaminada (Meng and Doyle , 2002).

En Australia, durante la última década del siglo XX, los casos de salmonelosis se han promediado anualmente alrededor de 6000 y han sido entre 4600 en 1992 a 7700 casos en 1998. (Sumner et al., 2004).

Los alimentos ya no son considerados sólo por los consumidores en términos de sabor y las necesidades nutritivas inmediatas pero también en términos de su habilidad de proporcionar beneficios específicos por encima de su valor nutritivo básico. Las comidas funcionales se ha vuelto un importante y rápidamente el segmento que ensancha del mercado de los alimentos como la comida procesada busca mejorar porción del mercado promoviendo los beneficios de salud proporcionado por ingredientes funcionales en sus productos. Las comidas compradas tienden a mejorar el equilibrio y actividad del entorno intestinal, actualmente proporcionan el segmento más grande de mercado de comida funcional en Europa, Japón y Australia (Saarela et al., 2002).

Las nuevas tendencias en las prácticas de cultivo, la globalización en los mercados, y el desarrollo de nuevos productos y métodos de la producción representa los nuevos desafíos para la inocuidad alimentaria. Los métodos tradicionales de controlar la erupción microbiana y la inocuidad se arriesga en las comidas, la esterilización y uso de preservadores, está reemplazándose por nuevas técnicas que incluyen la calefacción apacible, la atmósfera modificada y empaquetamiento al vacío, y el uso de sistemas antimicrobianos naturales (Tjakko Abee et al., 2000).

3.6.- BACTERIAS

3.6.1.- *Bacillus cereus*

El *Bacillus cereus* es una bacteria móvil, formadora de esporas, anaerobia facultativa, gram-positiva (Periago et al., 2004). Algunas cepas tienen la habilidad de crecer a temperaturas bajas. Es un patógeno asociado a menudo con dos tipos de enfermedades portadas por alimentos, diarrea y el síndrome emético, causado por dos toxinas distintas. Este microorganismo es extensamente distribuido en el ambiente natural y es fácilmente propagado a muchos tipos de alimentos, sobre todo aquéllos de origen vegetal (Ultee and Smid, 2001).

Muchos autores han documentado ampliamente la presencia de *B. cereus* en carne cruda y procesada, verduras, arroz y productos lácteos. Debido a esto el *B. cereus* se está volviéndose uno de las causas más importantes de envenenamiento de alimento en el mundo industrializado. (Periago et al., 2004)

La exposición de *B. cereus*, del carvacrol a concentraciones de 1 µl lleva a una extensión del retraso de la fase de crecimiento, y una densidad de la población final más baja (Ultee et al., 2002).

3.6.2.- *Escherichia coli*

E.coli O157:H7 se llama así porque expresa el antígeno somático (O) 157 identificado y el séptimo antígeno flagelar (H). Fue identificada como patógeno de humanos en 1982. Uno de los varios serotipos productores toxinas Shiga causan enfermedades humanas, el organismo probablemente evoluciono a través de la adquisición horizontal de genes para las toxinas Shiga y otros factores de virulencia. *E.coli* O157:H7 regularmente se encuentra en las heces de vaca saludables y se transmite a humanos a través de alimentos contaminados, agua y contacto directo con personas

infectadas o animales. La infección humana esta asociada con un amplio rango de enfermedades clínicas incluyendo evacuaciones asintomáticas, diarreas no sanguinolentas, colitis hemorrágicas, síndrome urémico hemolítico y muerte dadas que las diversas practicas de laboratorio varían, los médicos necesitan conocer si los laboratorios dentro de sus pruebas rutinarios determinan *E.coli* O157:H7 en especimenes fecales (Vázquez-Arroyo, 2004).

3.6.3.-*Pseudomona aureginosa*

Es un habitante común de los suelos y tiene una distribución mundial. El intestino del ser humano no parece ser hábitat importante de *P. aureginosa*, pero se le encuentra en 1 de 10 heces normales. Los pacientes se hacen susceptibles a infecciones de *P. aureginosa* después de un tratamiento prolongado con agentes inmunosupresivos, corticosteroideos, antimetabolitos, antibióticos y radiaciones. Este microorganismo ha adquirido mayor importancia a consecuencia de la resistencia a la terapia antibiótica. Produce variedad de enzimas como el hemolisina, lipasa, esterasa, lecitinasa, elastasa, fosfolipasa, endotoxina, enterotoxina, y exotoxina, algunas de las cuales pueden contribuir a su patogenicidad (Lennette et al, 1982).

3.6.4.- *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son cocos gram positivos que crecen en racimos irregulares en forma de uva, tétradas, cadenas cortas (tres o cuatro células) y pares. No son móviles, no forman esporos, son catalasa-positivos, aerobios y anaerobios facultativos; *S. aureus* causa la mayoría de las infecciones supurativas superficiales, gran porcentaje de casos de envenenamiento se dan por los alimentos. Los cultivos de *staphylococcus aureus* recién aislados de muestras clínicas y cultivados en agar sangre son generalmente hemolíticos producen un pigmento amarillo dorado y son coagulasa-positivos (Lennette et al, 1982).

3.6.5.- *Salmonella Typhimurium*

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae son bacilos aerobios gram-negativos(Lennette et al, 1982). *Salmonella* es el segundo causante de enfermedad portada por alimentos en la mayoría de los países desarrollados, causan diarrea, calambres, vomito, y a menudo la fiebre (Favrin et al., 2003).

Mientras que la industria avícola con los productos del huevo continúan siendo vehículos mayores para la transmisión de *Salmonella*, se ha implicado cada vez más como resultado de la ingesta de frutas crudas y verduras. Debido a las prácticas agrícolas modernas, como irrigación con agua contaminada o fertilización con estiércol, lodo del alcantarillado, y la excreta de animal. Así, los métodos eficaces por eliminar salmonella en las comidas son indispensables para la salud pública (Touch et al., 2004).

Casi 1.4 millones de casos de salmonellosis ocurren cada año en los Estados Unidos de los que 95% son casos causados por alimentos. Una variedad de alimentos se han implicado como vehículos que transmiten salmonellosis a los humanos, incluso el pollo, la carne de res, la carne de cerdo, los huevos, leche, queso, pescado, marisco, frutas frescas, jugo y verduras. La contaminación puede ocurrir en los pasos múltiples a lo largo de la cadena alimenticia incluso en la producción, procesamiento, distribución, comercialización, el manejo y en la preparación (Zhao et al., 2003).

El principal hábitat de *Salmonella* es el tracto intestinal del hombre y de los animales. La naturaleza de la acción patogénica de salmonella varia con el serovar, cepa, la dosis de infección, la naturaleza del alimento contaminado y el estado del huésped. Ciertos serovares son altamente patogénicos para los humanos; el poder patogénico de varios serovares es desconocido (Vázquez-Arroyo, 2004).

IV.-Materiales y Métodos

4.1.-Material vegetativo

Las partes aéreas de *Lippia graveolens* en floración fueron colectadas en septiembre-noviembre del 2004, de poblaciones silvestres en el Barrial de Guadalupe, Municipio de Torreón, Coahuila, latitud norte 25° 00', longitud oeste 103°14' y 1320 msnm. El *Thymus vulgaris* se compro en el mercado local ya que esta no se encuentra de manera silvestre en la región.

4.2 .-Extracción del Aceite Esencial

Los aceites esenciales se obtuvieron de las partes aéreas de las plantas (hojas, ramas y flores) desecadas al sol, por hidrodestilación (arrastre de vapor), durante 3 horas usando un aparato tipo Rotavapor Buche R-220 modificado.

4.3.- Caracterización de los aceites esenciales

La caracterización del aceite.- Se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación de los Recursos Naturales (CIReNa), de Salaces, Chihuahua. En un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer, La columna usada para el análisis de cromatografía fue PE-5 columna capilar (30 m x 0.25 mm i.d. espesor de la membrana 0.25µm). El gas acarreador usado fue el helio e hidrogeno y aire cero. Las condiciones de inyector a 265 °C, línea de transferencia 225 °C, y siguiendo un programa de temperaturas de 55 °C por minuto y llevándolo a 95 °C con una rampa de 3 °C por minuto y terminar a 220 °C con una rampa de 25 °C , manteniéndose por 10 minutos, con un tiempo total de 27.06 minutos. Las cantidades relativas de los porcentaje fue calculado para el total de iones del cromatógrama de los compuestos separados eran calculad o del cromatógrama del ion total por una computadora integrada.

00061

4.4.- Cepas bacterianas

Las bacterias ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Escherichia coli* ATCC 25922, fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Bacteriología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

4.5.-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La estimación de la (CMI), la concentración más baja del aceite esencial a la que el microorganismo probado no demostró crecimiento visible, se llevó a cabo por el método de dilución en caldo. Los tubos contenían 4 ml de Caldo Mueller-Hinton, 0.25 ml de la dilución de aceite esencial, de *Lippia graveolens* al 0.4% en etanol al 96% en diluciones que fueron de 19 a 0.29 $\mu\text{l/ml}$. Para el aceite esencial de *Thymus vulgaris* se agregó al tubo 0.50 ml al 0.5% en etanol al 96% en diluciones desde 36 a 0.55 $\mu\text{l/ml}$. y inoculados a 1 ml. de una suspensión de los microorganismos que se ajustó a una densidad de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de acuerdo al 0.5 nefelómetro de Mc. Farland en tubos de ensayo de 10 ml. Se tomaron los valores de la CMI como la concentración más baja de extracto que completamente inhibió el crecimiento bacteriano después de 20 h de incubación a 35 °C. (NCCLS, 1997). Después de lo cual se leyó la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro "Spectronic 20 Genests" a 625 nm (Lennette et al., 1982). Se usó un testigo sin el extracto. Cada experimento se repitió tres veces.

V.-Resultados

5.1. Caracterización del aceite esencial de *Lippia graveolens* y *Thymus vulgaris*

5.1.1. *Lippia graveolens*

Los datos obtenidos de la caracterización de los aceites a través del análisis de cromatografía de gases, se muestra en el Cuadro 1 donde se observa que para el aceite esencial de *Lippia graveolens* el carvacrol es el componente con mayor porcentaje con un 95.86%, seguido por el eucaliptol con 3.06 %, en esta muestra el timol esta presente con 1.08%, el precursor del carvacrol (p-cimeno) no esta presente.

Cuadro 1. Componentes principales del aceite esencial de *Lippia graveolens*.

Componentes	Porcentaje %
Carvacrol	95.86
Timol	1.08
p-cimeno	0
Eucaliptol	3.06

5.1.2. *Thymus vulgaris*

Los resultados del análisis del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, Cuadro 2. revelo que contiene un 99.71% de timol y p-cimeno con un 0.29%. El carvacrol no esta presente en la muestra.

Cuadro 2. Componentes principales del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Componentes	Porcentaje %
Carvacrol	0
Timol	99.71
p-cimeno	0.29
Eucaliptol	0

5.2. Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana fue determinada por el método de dilución en caldo de medio caldo Mueller-Hinton. Los resultados obtenidos para el aceite esencial de *Lippia graveolens*, Cuadro 3. muestra que la bacteria con mayor susceptibilidad fue *S. aureus* con 1.1 $\mu\text{l/ml}$ de CMI y la de mayor resistencia fueron *S. tiphymurium* 14028 y *B. cereus* 11778 con 9.5 $\mu\text{l/ml}$ de CMI.

Cuadro 3. Actividad antibacteriana del (CMI) del aceite esencial de *Lippia graveolens* para cepas ATCC.

Bacteria	CMI ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> 25922	2.3
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	1.1
<i>Pseudomonas auroginosa</i> 27853	4.7
<i>Salmonella tiphymurium</i> 14028	9.5
<i>Bacillus cereus</i> 11778	9.5

En lo que respecta al aceite esencial de *Thymus vulgaris* las CMI se observan que la bacteria con mayor susceptibilidad fue la *S. aureus* 25923 con 2.2 ($\mu\text{l/ml}$) y las bacterias que mostraron mayor resistencia fueron resistencia fueron *B. cereus* 11778 y *S. tiphymurium* 14028 con 0.1670 $\mu\text{l/ml}$ de CMI (Cuadro 4.).

Cuadro 4. Actividad antibacteriana del (CMI) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* para cepas ATCC.

Bacteria	CMI ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Escherichia coli</i> 25922	4.5
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	2.2
<i>Pseudomonas auroginosa</i> 27853	9
<i>Salmonella tiphymurium</i> 14028	18
<i>Bacillus cereus</i> 11778	18

VI. DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de los aceites esenciales

6.1.1. *Lippia graveolens*

El análisis del aceite esencial de *Lippia graveolens* permitió observar que el compuesto más abundante de la muestra fueron el carvacrol, con un 95.86%, lo que nos muestra que es de excelente calidad debido a que este compuesto es el que mayor efecto antimicrobiano posee (Ultee et al., 2002). Los porcentajes del carvacrol reportados por (Salgueiro et al., 2003a) en las dos muestras utilizadas de aceite esencial de *Lippia graveolens* fueron de el 44.8 y el 0.2% muy por debajo del el 95,86% que contenía el aceite que se utilizo en este experimento. Haciendo una comparación con el contenido de carvacrol de otras especies usadas en los experimentos, como *Oreganum vulgare* el resultado de esta fue de 68.1% (Salgueiro et al., 2003b) también por debajo de nuestra muestra. En lo que respecta a la ausencia del p-cimeno en los resultados del análisis pudo ser debido a la etapa fonológica en que fue colectada la planta (la floración) y todo había pasado a ser carvacrol debido a que este es su precursor (Salgueiro et al., 2003a).

Los resultados son importantes debido a que según reportes previos (Bagamboula et al., 2004; Horváth et al., 2002; Lahlou, 2004; Olasupo et al., 2003; Schwämmle et al., 2001; Ultee et al., 2002; Ultee et al., 1999), la actividad antimicrobiana del aceite de orégano dependen de su contenido en carvacrol y timol (Valentao et al., 2002b).

6.1.2. *Thymus vulgaris*

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* contiene una mayor porcentaje de timol 99.71 %, que el reportado por (Bagamboula et al., 2004) con 45.70%. Con lo cual se manejo el timol casi puro para las pruebas como antibacteriano.

6.1.3 CMI del Aceite esencial de *Lippia graveolens*

Las CMI del Aceite esencial de *Lippia graveolens* obtenidas para las cinco bacterias utilizadas muestra que las bacterias Gram negativas muestran mayor resistencia a las Gram positivas debido a la forma de actuar a excepción de *Bacillus cereus* 11778 quizás por su forma de crecimiento (Ultee et al., 1999).

Los resultados muestran que la CMI para las bacterias *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 es seis veces menor a la reportada por (Salgueiro et al., 2003a), debido quizás a las diferentes concentraciones de carvacrol en los aceites esenciales empleados.

Pseudomonas auroginosa 27853 como lo menciona (Schwämmle et al., 2001) que esta bacteria es capaz de degradar el carvacrol sólo parcialmente. *P. auroginosa* 27853 reporto una CMI media de acuerdo a las demás bacterias por lo que no encontramos evidencias de que esta bacteria sea capaz de degradar el carvacrol parcialmente (Schwämmle et al., 2001).

6.1. 4. CMI del Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

La CMI del el aceite de *Thymus vulgaris* para la bacteria *P. auroginosa* no fue alta por lo que no se encontró evidencia de que esta bacteria es capaz de degradar completamente el timol, componente principal del aceite utilizado (Schwämmle et al., 2001).

Se mostró que se requiere el doble del aceite de *Thymus vulgaris* que el de *Lippia graveolens* para la CMI.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo planteado sobre la caracterización del aceite esencial de *Lippia graveolens* obtenido de el ejido Barrial de Guadalupe, municipio de Torreón, Coahuila, Méx. se puede afirmar que tiene un alto contenido de carvacrol por lo que se deduce que es de excelente calidad.

La caracterización de aceite esencial de *Thymus vulgaris* que el componente timol es el mas abundante en la muestra, por lo que se considera de excelente calidad.

Con respecto al potencial antibacteriano del aceite esencial de *Lippia graveolens* demostró tener magnificas cualidades para inhibir el crecimiento a bajas concentraciones de todas las bacterias probadas pero de mejor manera con las Gram positivas.

Thymus vulgaris mosto tener muy buen potencial antibacteriano para inhibir el crecimiento de las bacterias probadas y al igual que el de *Lippia graveolens*, fue mejor con las Gram positivas.

La posibilidad de utilizar en forma extensa el aceite esencial de *L. graveolens* para infecciones bacterianas requieren que se continué con pruebas *in vitro* para otros grupos bacterianos y de hongos así como con pruebas *in vivo* para las bacterias que presentaron sensibilidad en la pruebas *in vitro*. Son necesarios también más estudios que permitan identificar la farmacodinamia y la farmacocinética de este recurso natural.

REFERENCIAS

- Abe, F., T. Nagao, and H. Okabe. 2002. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of lippia dulcis and lippia canescens. Biol Pharm Bull 25: 920-922.
- Bagamboula, C., M. Uyttendaele, and J. Debevere. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards shigella sonnei and s. Flexneri. Food Microbiology 21: 33-42.
- Bassolea, I. H. et al. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of lippia chevalieri and lippia multi.Ora from burkina faso. Phytochemistry 62: 209-212.
- Bergonzelli, G. E., D. Donnicola, N. Porta, and I. E. Corthesy-Theulaz. 2003. Essential oils as components of a diet-based approach to management of helicobacter infection. Antimicrob Agents Chemother 47: 3240-3246.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol 94: 223-253.
- Dorman, H. J. D., S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88: 308-316.
- Faleiro, M. L. et al. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from portuguese endemic species of thymus. Lett Appl Microbiol 36: 35-40.
- Favrin, S. J., S. A. Jassim, and M. W. Griffiths. 2003. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of salmonella enteritidis and escherichia coli o157:H7 in food. Int J Food Microbiol 85: 63-71.

- Font-Quer, P. 1979. Diccionario de botanica. Primera edición ed. Labor S.A., Barcelona España.
- Gulluce, M. et al. 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *satureja hortensis* L. J Agric Food Chem 51: 3958-3965.
- Hernández-Zamudio, G., M. R. Guerrero, S. M. Luevano, C. E. Blanco, and R. S. Alonzo. 2005. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de oregano *lippia graveolens* (h.B.K.). En: G. Lorence-F., M. Almeida R., H.Bejar-M. Oregano aprovechamiento, cultivo e industrialización en México. UACH, México: 153-158.
- Horváth, G., B. Kocsis, L. Botz, J. Németh, and L. Szabó. 2002. Antibacterial activity of thymus phenols by direct bioautography. Acta Biologica Szegediensis 46: 145-146.
- Huerta, C. 2002. Oregano mexicano; el oro vegetal. CONABIO.
- Kalembe, D., and A. Kunicka. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 10: 813-829.
- Lahlou, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytother Res 18: 435-448.
- Lenette, E. H., A. Balows, W. J. Hausler, and J. P. Truant. 1982. Manual de microbiología clínica . 3a edición ed, Buenos Aires, Argentina.
- Lopez-Malo, A., S. M. Alzamora, and E. Palou. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. Int J Food Microbiol 73: 213-218.

- Maldonado, A. L. J. 1991. Descripción botánica, distribución y usos del orégano en México. En Meléndez, G.R. y Peña R. Estado actual del conocimiento sobre orégano en México. URUZA-UACH, Bermejillo Dgo. México.
- Meng, J., and M. P. Doyle. 2002. Introduction. Microbiological food safety. *Microbes Infect* 4: 395-397.
- NCCLS. 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-fourth edition. National committee clinical laboratory standards. Approved Standard M7-A4.
- Nelson, R. R. S. 2003. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 40: 305-306.
- Olasupo, N. A., D. J. Fitzgerald, M. J. Gasson, and A. Narbad. 2003. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Lett Appl Microbiol* 37: 448-451.
- Pascual, M. E., K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata, and A. Villar. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J Ethnopharmacol* 76: 201-214.
- Periago, P. M., B. Delgado, P. S. Fernandez, and A. Palop. 2004. Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. *J Food Prot* 67: 1408-1416.
- Rastrelli, L., A. Cáceres, C. Morales, F. De Simone, and R. Aquino. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49: 1829-1832.
- Rzedosdowsky, J. 1978. La vegetación de México. Limusa, México.

- Saarela, M., L. Lahteenmaki, R. Crittenden, S. Salminen, and T. Mattila-Sandholm. 2002. Gut bacteria and health foods--the european perspective. *Int J Food Microbiol* 78: 99-117.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves, and A. P. da Cunha. 2003a. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *lippia graveolens* from guatemala. *Planta Medica* 69: 80-83.
- Salgueiro, L. R. et al. 2003b. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *origanum virens* on candida species. *Planta Med* 69: 871-874.
- Schwämmle, B., E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, and W. Steiner. 2001. Isolation of carvacrol assimilating microorganisms. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 341-345.
- SEMARNAP-PROCYMAF. 2001. Especies forestales no maderables y maderables no tradicionales de zonas aridas y semiaridas en los estados de durango, chihuahua, jalisco, michoacan, guerrero y oaxaca, Mexico.
- Soboleva, T. K., Pleasants, A.B., Roux, L. 2000. Predictive microbiology and food safety. *International Journal of Food Microbiology* 57 (2000) 183-192.
- Stashenko, E. E., B. E. Jaramillo, and J. R. Martinez. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *lippia alba* (mill.) n.E. Brown, grown in colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A* 1025: 93-103.

- Sumner, J., G. Raven, and R. Givney. 2004. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of salmonella or of salmonellosis? *Int J Food Microbiol* 92: 199-205.
- Tepe, B., D. Daferera, M. Sokmen, M. Polissiou, and A. Sokmen. 2004. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *thymus eigi* m. Zohary et p.H. Davis. *J Agric Food Chem* 52: 1132-1137.
- Tjakko Abee, W. v. S. a. R. J. S. 2000. Impact of genomics on microbial food safety. *TRENDS in Biotechnology* Vol.xx No.xx Monthxxxx 20.
- Touch, V., S. Hayakawa, S. Yamada, and S. Kaneko. 2004. Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on salmonella enteritidis in animal or vegetable foods. *Int J Food Microbiol* 93: 175-183.
- Ultee, A., M. H. Bennik, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1561-1568.
- Ultee, A., E. P. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 65: 4606-4610.
- Ultee, A., and E. J. Smid. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 64: 373-378.
- Valentao, P., P. B. Andrade, F. Areias, F. Ferreres, and R. M. Seabra. 1999. Analysis of vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control. *J Agric Food Chem* 47: 4579-4582.

- Valentao, P. et al. 2002a. Studies on the antioxidant activity of lippia citriodora infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol. Pharm. Bull. 25: 1324-1327.
- Valentao, P. et al. 2002b. Studies on the antioxidant activity of lippia citriodora infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biol Pharm Bull 25: 1324-1327.
- Vázquez-Arroyo, J. 2004. Microbiología sanitaria, Torreón Coahuila, México.
- Zhao, S. et al. 2003. Antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from imported foods. Int J Food Microbiol 84: 87-92.