

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Actividad antimicótica *in vitro* de aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Nuez, Romero (*Rosmarinus officinallis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Lippia graveolens*) contra hongos.

Tesis

Que presenta **GUILLERMO MUÑOZ SERRANO**

Como requisito parcial para obtener el Título de

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Asesor principal

MC. José Luis Corona Medina

Torreón, Coahuila

Mayo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

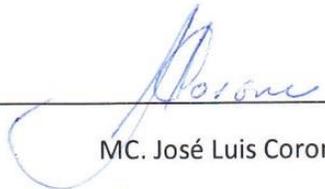
Actividad antimicótica *in vitro* de aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Nuez, Romero (*Rosmarinus officinalis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Lippia graveolens*) contra hongos.

Tesis

Elaborada por **GUILLERMO MUÑOZ SERRANO** como requisito parcial para obtener el Título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA** con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.

APROBADA POR

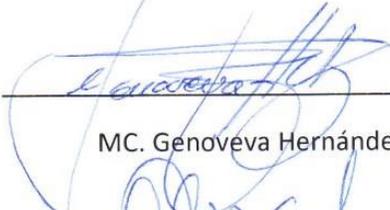
Asesor principal:


MC. José Luis Corona Medina

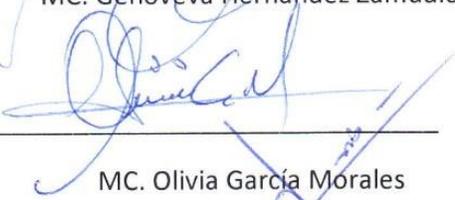
Asesor:

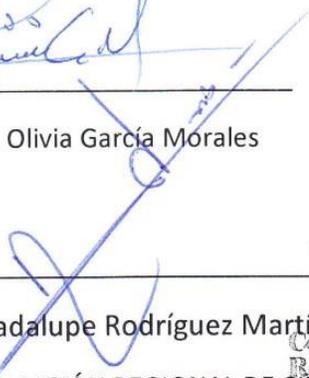

MC. Margarita Yolanda. Mendoza Ramos

Asesor:

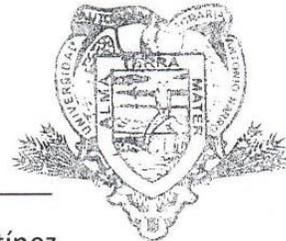

MC. Genoveva Hernández Zamudio

Asesor:


MC. Olivia García Morales


MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila

Mayo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

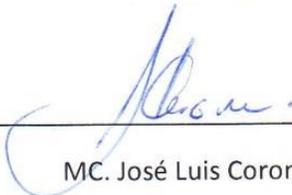
Actividad antimicótica *in vitro* de aceites esenciales de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Nuez, Romero (*Rosmarinus officinallis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Orégano (*Lippia graveolens*) contra hongos.

Tesis

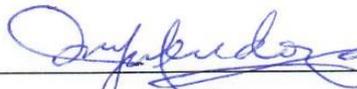
Elaborada por **GUILLERMO MUÑOZ SERRANO** como requisito parcial para obtener el Título de **MÉDICO VETERINARIO ZOTECNISTA** con la consideración del H. JURADO EXAMINADOR.

APROBADA POR

Presidente:


MC. José Luis Corona Medina

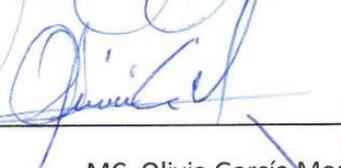
Vocal:

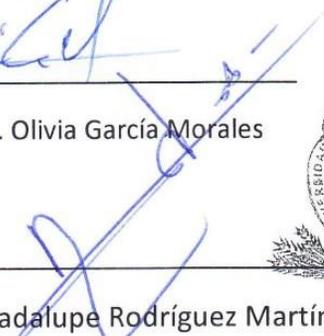

MC. Margarita Yolanda. Mendoza Ramos

Vocal:


MC. Genoveva Hernández Zamudio

Vocal suplente:


MC. Olivia García Morales


MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Torreón, Coahuila

Mayo 2018

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme terminar esta etapa de mi vida con salud, bendiciones y amor.

A mis **padres**, Amada Olivia Serrano Carrillo y Guillermo Muñoz Dávila por el apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

A mi **hermana**, A. Olivia Muñoz Serrano, por estar conmigo en todo momento, darme felicidad y buenos momentos.

A **Hugo R.** por impulsarme a ser una mejor persona en el ámbito laboral, el ejemplo que me brinda de sus logros, el cariño y el apoyo incondicional que me ha ofrecido.

A mi **mejor amiga** Jessica Mendoza Murillo, por siempre estar para mí en las buenas y en las malas, brindándome consejos y apoyándome en mis decisiones.

A mis **amigos**, Ayde Samaniego, Inés Elizabeth Torres, Italia I. García Astorga, Melissa de Ávila, Nidia C. Orozco Hernández, Degni Ileana Armendáriz, Lidia Ojeda, Osiris Valles, Sindy Estrada, Sandra Ahidé, Marifer Reyna, Jennifer Miramontes, Saraí Peralta, Kikis Cruz, Eleazar Moreno, Pamela Reyes, Jairo Paniagua, gracias por el apoyo, el compañerismo, los buenos deseos y los momentos que pasamos juntos.

A mis **familiares**, por ser una parte fundamental en mi vida.

A mi **profesor, tutor y amigo**, Jesús Quezada Aguirre, por guiarme, escucharme, apoyarme, aconsejarme, motivarme y estar siempre que lo necesité, de verdad muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mis **padres**, Amada Olivia Serrano Carrillo y Guillermo Muñoz Dávila, por creer en mí y siempre impulsarme con los valores que me inculcaron a ser una mejor persona y ser un buen profesionista aplicando su ejemplo.

A mis **profesores**, por haberme compartido su conocimiento, en especial al MC José Luis Corona Medina, MC Margarita Yolanda Mendoza Ramos, MC Olivia García Morales, Dra. María Hortensia Cepeda Elizalde, MC. Genoveva Hernández Zamudio por haberme apoyado en este proyecto, educarme académicamente y sus consejos.

A mi **profesor, tutor y amigo**, Jesús Quezada Aguirre.

RESUMEN

Las plantas aromáticas han sido utilizadas en la medicina popular por poseer compuestos con cualidades terapéuticas como lo son los aceites esenciales, éstos son compuestos activos contra microorganismos patógenos como los hongos. Las infecciones por hongos han sido un problema creciente en las últimas décadas y la mayor incidencia se da en personas que están inmunocomprometidas. En el presente trabajo se determinó el efecto antimicótico de 5 aceites esenciales, eucalipto (*Eucalyptus globulus*), nuez, romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*) a concentraciones de 100, 50 y 25% diluido con aceite mineral añadiendo 0.1 ml de cada aceite en micro pozos hechos en agar PDA en placas Petri inoculadas con solución de esporas de tres hongos diferentes, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Curvularia lunata*, dejándola incubar para posteriormente determinar la actividad antimicótica observando el diámetro del halo de inhibición. Como resultado se obtuvo una potente acción antimicótica en aceites de tomillo y orégano al 100% en *A. niger*, *flavus* y *C. lunata* mientras que el de romero fue menor su acción. Se descartaron el aceite de nuez y eucalipto ya que no presentaron acción antimicótica. En el estudio de concentración al 50%, el aceite de orégano fue el que mayor halo de inhibición mostró en *A. niger* y *C. lunata* pero en *A. Flavus* fue mayor el halo de inhibición que presentó el tomillo y al aceite de romero los hongos presentaron resistencia. En resultados de la concentración al 25% *A. niger* y *A. flavus*, el aceite de tomillo fue el que mayor halo de inhibición presentó, mientras que en *C. lunata*, fue el aceite de orégano. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el efecto antimicótico de cada aceite va de acuerdo con la composición química que posee cada uno.

Palabras clave: Aceite esencial, Actividad antimicótica, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Lippia graveolens*.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.2. Hipótesis	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Aceites esenciales	2
2.1.1. Propiedades	3
2.1.2. Mecanismo de acción	3
2.2. Aceite esencial de eucalipto	4
2.2.1. Origen	4
2.2.2. Propiedades	4
2.2.3. Composición	5
2.3. Aceite esencial de tomillo	6
2.3.1. Origen	6
2.3.2. Propiedades	6
2.3.3. Composición	7
2.4. Aceite esencial de orégano	7
2.4.1. Origen	7
2.4.2. Propiedades	7
2.4.3. Composición	8
2.5. Aceite esencial de romero	8
2.5.1. Origen	8
2.5.2. Propiedades	9
2.5.3. Composición	9
2.6. Aceite esencial de nuez	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Localización y área de estudio	9
3.1.1. Hongos	10
3.1.2. Aceites esenciales	10
3.1.3. Materiales de laboratorio	10
3.1.4. Medios de cultivo	11
3.1.5. Reactivos	11
3.2. Identificación morfológica de los hongos	11

3.3. Identificación microscópica de los hongos	11
3.4. Actividad antifúngica	12
3.4.1. Método de difusión en agar	12
3.4.1.1. Preparación de la solución de esporas	13
3.4.1.2. Preparación de las placas para concentración al 100%	14
3.4.1.3. Preparación de las placas para concentraciones del 50 y 25%	15
3.4.2. Inoculación del aceite a los pozos	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Resultados de los hongos por su análisis morfológico.	15
4.2. Determinación de la actividad antimicótica de acuerdo a la concentración	17
4.2.1. Resultados al 100%	18
4.2.2. Resultados al 50%	20
4.2.3. Resultados al 25%	23
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES	26
7. LITERATURA CITADA	27

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.	
Cuadro 1	Actividad antimicótica de los aceites. (R) Resistente, (M) Moderadamente sensible, (S) Sensible.	18
Cuadro 2	Medida de halo inhibitorio de aceites en <i>A. niger</i>	20
Cuadro 3	Medida del halo inhibitorio de los aceites en <i>A. flavus</i>	21
Cuadro 4	. Medida del halo inhibitorio en aceites en <i>C. lunata</i> .	22
Cuadro 5	Medida del halo de inhibición de los aceites en <i>A. niger</i> .	23
Cuadro 6	Medida del halo de inhibición de los aceites en <i>A. flavus</i> .	24
Cuadro 7	Medida del halo de inhibición de los aceites en <i>C. lunata</i> .	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Técnica de tinción de hongos	12
Figura 2.	Preparación de Infusión cerebro y corazón	13
Figura 3.	Elaboración de la suspensión de esporas	14
Figura 4	A, muestra adición de 1ml de suspensión de esporas a la caja Petri. B, realización de micropozos. C y D colocación del aceite esencial al 100%.	15
Figura 5	Morfología de hongos	17
Figura 6.	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para <i>Aspergillus niger</i> . (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	18
Figura 7.	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para <i>Aspergillus flavus</i> . (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	19
Figura 8	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para <i>Curvularia lunata</i> . (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones	19
Figura 9	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para <i>Aspergillus niger</i> . (T) tomillo, (O) orégano, (R) romero. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	20
Figura 10.	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para <i>Aspergillus flavus</i> . (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	21
Figura 11.	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para <i>Curvularia lunata</i> . (T) tomillo, (O) orégano, (R) romero. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	22
Figura 12	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para <i>Aspergillus niger</i> . (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	23
Figura 13.	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para <i>Aspergillus flavus</i> . (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	24
Figura 14	Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para <i>Curvularia lunata</i> . (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.	25

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos se han reconocido cada vez más como agentes patógenos importantes en pacientes críticamente enfermos. Durante la última década, las infecciones por hongos, principalmente las causadas por microorganismos oportunistas, han sido un problema de creciente importancia clínica (de Lira Mota *et al.*, 2012). La mayor incidencia de infecciones fúngicas entre personas inmunocomprometidas y el desarrollo de resistencia antimicótica con tratamiento prolongado han generado un interés sustancial en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos terapéuticos (Giordani *et al.*, 2004). La situación con respecto a los fármacos antifúngicos actualmente disponibles y el tratamiento de las infecciones por hongos está lejos de ser ideal (Vale-Silva *et al.*, 2010). Por lo tanto, el aumento de la resistencia a los agentes antifúngicos convencionales, la toxicidad y los costos involucrados justificaron la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos más eficaces, respetuosos con el medio ambiente y menos tóxicos como alternativa para el tratamiento de las infecciones por hongos (Asdadi *et al.*, 2015). Las plantas aromáticas han sido ampliamente utilizadas en la medicina popular (Pinto *et al.*, 2006). Los compuestos derivados de las plantas son siempre una fuente de nuevos productos terapéuticos. Se sabe que las plantas producen una enorme variedad de moléculas pequeñas conocidas como fitoalexinas tales como terpenoides, glucoesteroides, flavonoides y polifenoles. La mayoría de estas pequeñas moléculas tienen una actividad antimicrobiana débil, varios órdenes de magnitud menor que la de los antibióticos comunes producidos por bacterias y hongos. A pesar del hecho de que los antibacterianos derivados de las plantas son menos potentes, las plantas combaten las infecciones con éxito. Las plantas aromáticas y medicinales también producen una amplia variedad de hidrocarburos volátiles alifáticos y cíclicos, derivados isoprenoides oxigenados correspondientes y análogos que forman mezclas complejas llamadas aceites esenciales (Scazzocchio *et al.*, 2016). Estos compuestos antimicrobianos producidos por las plantas son activos contra microorganismos patógenos vegetales y humanos (Rojas *et al.*, 2003). Las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales de las plantas se conocen desde hace muchos

siglos. Incluso antes del descubrimiento de microorganismos, se descubrió que las plantas eran eficaces contra enfermedades infecciosas (Zouhir *et al.*, 2016). De acuerdo con los resultados preliminares de Pinto *et al.* (2006), algunos aceites esenciales muestran una importante actividad antifúngica contra levaduras, hongos dermatofitos y cepas de *Aspergillus*, que podrían predecir beneficios terapéuticos, principalmente para enfermedades con afectación mucosa, cutánea y del tracto respiratorio.

Con el presente estudio se determinará la actividad antimicótica in vitro que poseen los aceites en cuestión y se podrá dar a conocer si realmente pueden o no ser utilizados como una alternativa en contra de las infecciones micóticas.

1.1. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar la actividad antifúngica in vitro de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), nuez, romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*) contra hongos y su acción a concentraciones de 100, 50 y 25%.

1.2. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), nuez, romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*) presentan acción antifúngica in vitro contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Curvularia lunata*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas naturales de compuestos volátiles de origen terpenoide o no terpenoide. Monoterpenos, sesquiterpenos e incluso diterpenos son los principales constituyentes de muchos aceites esenciales. Además, los fenilpropanoides, ácidos grasos y sus ésteres también se encuentran como componentes volátiles. Estos metabolitos secundarios son liposolubles, hidrófobos y caracterizados por un fuerte olor (Vale-Silva *et al.*, 2010) En la naturaleza, estos aceites desempeñan un papel importante en la protección de las plantas, además de funcionar

como insecticidas y disuasivos al consumo de plantas por los herbívoros (Yousefzadi *et al.*, 2014). La cantidad, la calidad y los perfiles químicos de los aceites esenciales derivados de una sola especie vegetal pueden variar considerablemente según el origen geográfico, las condiciones climáticas, la composición del suelo, la parte de la planta utilizada y la edad y época de la recolección del material. Además, el proceso de secado y el tiempo de almacenamiento pueden alterar, cuantitativa y cualitativamente, la composición del aceite esencial (Radaelli *et al.*, 2016).

2.1.1. Propiedades

Las propiedades naturales de los aceites esenciales justifican su amplio uso, generalmente distribuido en la industria alimentaria, en su mayor parte, pero también en perfumería y cosmética, en la industria farmacéutica y como materiales de partida para el aislamiento de productos bioquímicos (Vale-Silva *et al.*, 2010). Se han identificado varias propiedades para estos aceites esenciales, por ejemplo, antiséptico para los pulmones (Belleste *et al.*, 2012). Los aceites esenciales son una rica fuente de compuestos biológicamente activos; Se demostró que poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales e insecticidas (Scazzocchio *et al.*, 2016). También algunos aceites producen efectos antioxidantes, antígenotóxicos y de eliminación de radicales libres, así como para ejercer una citotoxicidad manifiesta e inducir la apoptosis en células cancerosas (Yousefzadi *et al.*, 2014).

2.1.2. Mecanismo de acción

Los aceites esenciales afectan etapas del desarrollo de los hongos como la germinación de esporas, formación de estructuras de penetración, desarrollo de micelio y esporulación. Por lo general, la germinación de esporas y el desarrollo micelial son utilizados en estudios *in vitro* para subsecuentes aplicaciones (Velásquez *et al.*, 2014). Su modo de acción es probablemente debido a la ruptura de la membrana y la pared celular de bacterias y hongos por sus compuestos fenólicos, lo que lleva a la liberación del contenido de las células. Además, el amplio espectro de aceites esenciales está relacionado con la diversidad y complejidad de su composición química (Asdadi *et al.*,

2015). De igual manera, de Lira Mota *et al.* (2012) asegura que tales compuestos pueden alterar la permeabilidad celular por su inserción entre las cadenas de ácidos grasos que componen las bicapas lipídicas de las membranas, interrumpiendo así el empaque de lípidos, provocando alteraciones en las propiedades y funciones de la membrana celular aumentando su fluidez y permeabilidad. Además, debido a los múltiples sitios de acción a través de los cuales puede actuar un aceite esencial, el desarrollo de resistencia microbiana es muy bajo (Sampietro *et al.*, 2016).

2.2. Aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*).

2.2.1. Origen

Eucalyptus globulus es un árbol de hoja perenne, alto, o arbusto, perteneciente a la familia *Myrtaceae* (Tyagi *et al.*, 2014). Es nativo de Australia. Es el más cultivado en las regiones subtropicales y mediterráneas (Elaiissi *et al.*, 2012; Esmaeili *et al.*, 2012) El género *Eucalyptus* contiene alrededor de 700 especies; entre ellos, más de 300 contienen aceites volátiles en sus hojas. Los aceites esenciales de diversas especies de eucalipto se utilizan en los productos farmacéuticos, artículos de tocador, cosméticos y alimentos (Baptista *et al.*, 2015; Tyagi *et al.*, 2014).

2.2.2. Propiedades

Las plantas son consideradas como ricas fuentes de medicamentos de tratamiento antibiótico y la hoja de eucalipto con sus propiedades antimicrobianas se han utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas anteriormente en la medicina antigua (Panahi *et al.*, 2011). Varios estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales de diversas especies de *Eucalyptus* contra una amplia gama de microorganismos. Los aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus citriodora* y *Eucalyptus odorata* han mostrado una actividad fuerte, moderada o débil contra bacterias y hongos, incluyendo dermatofitos y *Candida albicans* (Baptista *et al.*, 2015; Elaiissi *et al.*, 2012). El eucalipto se cultiva principalmente por su madera, pulpa y aceites esenciales que presentan propiedades medicinales y usos terapéuticos. Se considera una fuente importante de

aceites esenciales utilizados en la medicina tradicional. Éste aceite se utiliza para aliviar resfriados, reumatismo, dolores musculares y como expectorante en casos de bronquitis (Ben Hassine *et al.*, 2012; Cermelli *et al.*, 2008) y la congestión de los senos paranasales, incluso también como antipirético (Miyamoto *et al.*, 2009). Estas amplias aplicaciones se deben a las propiedades antisépticas, antihiperoglucémicas, antiinflamatorias, aromatizantes y antioxidantes de las moléculas presentes en el aceite (Tyagi *et al.*, 2014) El efecto de los aceites puede extenderse debido a su hidrofobicidad y las vesículas de aceite prolongan la integridad (Martins *et al.*, 2013).

2.2.3. Composición

Los estudios sobre la composición química de los aceites esenciales de varias especies de eucaliptos han encontrado que el 1,8-cineol es el compuesto dominante. Sin embargo, estos estudios han mostrado grandes variaciones en la composición química de los aceites esenciales de diferentes especies e incluso de las mismas especies pero de diferentes regiones, ya que estos aceites volátiles se ven afectados por factores no genéticos como la edad de la hoja y las variaciones estacionales (Baptista *et al.*, 2015). Además, la actividad antimicrobiana de los aceites de eucalipto varía significativamente dentro de las especies microbianas y dentro de las cepas microbianas. La actividad antimicrobiana fuerte puede estar directamente asociada con sus compuestos principales en el aceite (tal como 1,8-cineol y α -pineno) o con la sinergia entre los constituyentes mayor y menor (Tyagi *et al.*, 2014). Como ya se mencionó, el constituyente principal del aceite de *E. globulus* es el eucaliptol (1,8-cineol) monoterpeno que induce la fragmentación del ADN y la inhibición de la síntesis de ADN en células eucariotas (Miyamoto *et al.*, 2009). De manera semejante en el estudio realizado por Baptista *et al.* (2015), establecen que los monoterpenos, representados esencialmente por α -pineno (hidrocarburo monocíclico); P-cimeno (aromático monocíclico); 1,8-cineol (éter); Y linalool, terpinen-4-ol y α -terpineol (alcoholes), resultaron ser los principales compuestos de éste aceite.

2.3. Aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)

2.3.1. Origen

En los últimos años, se ha investigado un gran número de aceites esenciales, especialmente aquellos de algunas especies de *Thymus* y sus componentes fenólicos, por sus propiedades antimicrobianas contra ciertas bacterias, protozoos y hongos (de Lira Mota *et al.*, 2012). El tomillo (*Thymus vulgaris* L.), miembro de la familia *Labiatae*, es una planta aromática y medicinal de creciente importancia en horticultura (Esmaeili *et al.*, 2012).

2.3.2. Propiedades

El aceite esencial de tomillo ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad y propiedades medicinales. Los informes indican que este aceite y sus especies relacionadas se encuentran entre los principales aceites esenciales utilizados en la industria alimentaria, además de los utilizados en cosméticos como conservantes y antioxidantes (Perina *et al.*, 2015). *T. vulgaris*, también conocido como tomillo común, se ha utilizado durante mucho tiempo como fuente del aceite esencial (aceite de tomillo) y otros compuestos (por ejemplo, timol, flavanoide, ácido cafeico y ácido labiatico) derivados de las diferentes partes de la planta (Esmaeili *et al.*, 2012). Es conocido como antiséptico, antiviral, y agente antimicrobiano (Sokovic *et al.*, 2009). Con concentraciones muy bajas son antifúngicos eficaces, el uso de este aceite esencial para el tratamiento de pacientes con dermatofitosis necesita ser explorado. Tiene el potencial de ser una buena alternativa a los fármacos antifúngicos convencionales que suelen ser caros y también con alta toxicidad, especialmente porque se requiere un tratamiento prolongado (Bellete *et al.*, 2012). Según los estudios realizados por Perina *et al.* (2015) *Thymus vulgaris* y *Thymus spp* han demostrado regularmente que funcionan bien, presentando ocasionalmente niveles de control comparables con los obtenidos con fungicidas comerciales.

2.3.3. Composición

En el aceite esencial de tomillo, se identificaron q-cimeno (19,8%), linalol (13,6%) y timol (12,1%) como componentes principales; También estaban presentes otros compuestos, tales como carvacrol, b-pineno, cariofileno, isoborneol, borneol y camfeno. Estos resultados concuerdan con informes previos que identifican composiciones similares (Reyes-Jurado *et al.*, 2016). *T. vulgaris*, con altas cantidades de fenoles, muestran un amplio espectro de actividad contra una variedad de levaduras patógenas y hongos filamentosos, incluyendo hongos con susceptibilidad disminuida al fluconazol (Nasir *et al.*, 2015).

2.4. Aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*)

2.4.1. Origen

Lippia graveolens son arbustos distribuidos en las Américas, originaria del sur de América del Norte, México, Guatemala, Nicaragua y Honduras. Varias especies del género *Lippia* se utilizan en la medicina popular en afecciones gastrointestinales, dermatológicas y respiratorias (Hernández *et al.*, 2008; Salgueiro *et al.*, 2003). Orégano ha sido ampliamente utilizado; es una de las especias culinarias más importantes del mundo. Se utiliza en diferentes tipos de alimentos, tales como productos de panadería, carne y productos cárnicos curados, verduras procesadas y aperitivos, entre otros (Gomez-Sanchez *et al.*, 2011). El orégano está entre las especias más comunes con actividad antimicrobiana reportada, y comprende muchas especias diferentes de interés económico, aunque pertenecen a diferentes familias y géneros botánicos. Se distinguen cuatro grupos principales comúnmente utilizados con fines culinarios, es decir, orégano griego (*Origanum vulgare L. ssp.*), orégano español (*Coridothymus capitatus*), orégano turco (*Origanum onites*) y el orégano mexicano (*Lippia graveolens* o *Lippia berlandieri*) (Portillo-Ruiz *et al.*, 2012).

2.4.2. Propiedades

La actividad antifúngica del aceite esencial de orégano se atribuye principalmente a los monoterpenos aromáticos carvacrol, timol y p-cimeno, además en el estudio realizado

por Rodríguez-García *et al.* (2015), menciona que sus hipotéticos mecanismos antifúngicos sugieren que su actividad está relacionada con su anillo aromático y los grupos hidroxilo, que pueden formar enlaces de hidrógeno con enzimas vitales del hongo.

2.4.3. Composición

Como ya se mencionó anteriormente, los principales compuestos de *L. graveolens* son O-cimeno, γ -terpineno, timol y carvacrol, Otros compuestos en proporciones inferiores incluyen α -pineno, cariofileno, camfeno, β -pineno, α -terpineol, y linalol. (Lara *et al.*, 2016; Reyes-Jurado *et al.*, 2016). La actividad antifúngica de estos compuestos se atribuye a su estructura y características lipofílicas. Su presencia en las membranas celulares causa una expansión, una mayor fluidez y permeabilidad, una alteración en las proteínas incrustadas, inhibe la respiración y altera el transporte iónico. También estos compuestos actúan como eliminadores de radicales libres a través de la donación de átomos de hidrógeno o electrones, ralentizando la oxidación de lípidos. Además, pueden interferir en la biosíntesis de fosfolípidos y esteroides de hongos (Rodríguez-García *et al.*, 2015).

2.5. Aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*)

2.5.1. Origen

Rosmarinus officinalis L., "romero" es un miembro de la familia *Lamiaceae*, un arbusto de hoja perenne con hojas aromáticas como agujas. Es nativo del Mediterráneo y Asia, pero ahora se cultiva en lugares templados alrededor del mundo como una planta de jardín decorativo y hierba culinaria. Las hojas de romero se han utilizado para dar sabor a los alimentos como el cordero, cerdo, pollo, pescado y rellenos, y para preparar aceites de hierbas, mantequillas y vinagres (Akbari *et al.*, 2015; Sadeh *et al.*, 2017; Satyal *et al.*, 2017). Esta planta ha sido utilizada en medicinas populares en Asia (India, China) en el Mediterráneo y otras regiones, así como en productos medicinales (Zheljazkov *et al.*, 2015).

2.5.2. Propiedades

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como saborizante y conservante, debido a la presencia de diterpenos fenólicos, que tienen propiedades antioxidantes (da Silva Bomfim *et al.*, 2015). El aceite de hojas de *Rosmarinus officinalis* posee acciones antitumorales y antiinflamatorias, actividad antimicrobiana (Mekonnen *et al.*, 2016), potenciadores de la cognición y circulación sanguínea local (Sadeh *et al.*, 2017) y propiedades antifúngicas (Sienkiewicz *et al.*, 2013). En la región mediterránea, una infusión de las partes aéreas se toma internamente para tratar los resfriados y la tos como un antiespasmódico, antihipertensivo y antiepiléptico, para tratar la diabetes, y los parásitos intestinales. Una maceración de *R. officinalis* en alcohol o aceite de oliva se utiliza externamente para tratar contusiones, reumatismo y dolores musculares y articulares (Satyal *et al.*, 2017).

2.5.3. Composición

En estudios realizados por diferentes autores (Akbari *et al.*, 2015; Cobellis *et al.*, 2016; da Silva Bomfim *et al.*, 2015; Radaelli *et al.*, 2016; Satyal *et al.*, 2017; Sienkiewicz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012), demostraron que *R. officinalis* es rico en monoterpenoides. Los componentes principales del aceite esencial fueron 1,8-cineol (15,96%), α -pineno (13,38%), alcanfor (7,87%), acetato de bornilo (6,54%), verbenona (5,82%), borneol (5,23%), canfeno (4,96%) y (E) -carofilato (3,8%), aunque cada autor maneja porcentajes diferentes de cada compuesto, no son muy variables.

2.6. Aceite esencial de nuez

No se encontraron resultados sobre actividad antimicótica de este aceite.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN Y ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el periodo que comprende del mes de octubre del 2016 hasta febrero del 2017 en el Laboratorio de Microbiología en la Unidad de

Diagnostico ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna que se encuentra en Periférico Raúl López Sánchez, Valle Verde, 27054 Torreón, Coahuila, México con coordenadas 25°33'21.8"N 103°22'25.4"W.

3.1.1. Hongos

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus flavus*
- *Curvularia lunata*

3.1.2. Aceites esenciales

- Eucalipto
- Nuez
- Romero
- Tomillo
- Orégano

3.1.3. Materiales de Laboratorio

- Caja Petri estériles desechables de 90 x 15 mm
- Pipeta Pasteur
- Balanza analítica
- Espátula
- Incubadora
- Micropipeta eppendorf
- Puntillas para micropipeta
- Frascos de dilución
- Pipetas estériles de 1 ml
- Aspirador de pipetas
- Encendedor para mecheros
- Probeta
- Viales

- Cinta adhesiva
- Marcador de cera
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Microscopio
- Matraces

3.1.4. Medios de cultivo

- Papa Dextrosa Agar (PDA) BD Bioxon
- Infusión Cerebro Corazón BD Bioxon

3.1.5. Reactivos

- Lactofenol azul de anilina
- Aceite mineral estéril

3.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLOGICA DE LOS HONGOS

Los hongos se obtuvieron del material de investigación que se encuentra en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad. Para el aislamiento, se tomó un asa de punta recta y se esterilizó al mechero, se enfrió en la caja con medio PDA estéril, después se tomaron esporas de un hongo que se encontraban en una caja Petri contaminada y se sembró en el centro de la caja Petri con medio PDA estéril y se volvió a esterilizar el asa. Este procedimiento se utilizó para cada una de las muestras de hongo. Posteriormente se dejó incubar por 5-10 días a temperatura ambiente y se observaron las características de las colonias.

3.3. IDENTIFICACIÓN MICROSCOPICA DE LOS HONGOS

Se utilizó la técnica de la cinta adhesiva.

Se preparó un portaobjetos, se identificó y se le agregaron 3 gotas de Lactofenol azul de anilina, luego se tomó un trozo de cinta adhesiva y se tomó una porción de la

colonia del hongo de la caja Petri con la parte adhesiva de la cinta y se colocó en un portaobjetos para su coloración. Posteriormente se colocó en el microscopio y se observaron las características microscópicas del hongo (Figura 1).



Figura 1. Técnica de tinción de hongos.

3.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Para evaluar la actividad antifúngica de cada aceite esencial contra los hongos, se utiliza el método de difusión descrito por Alcalá-Marcos *et al.* (2011) en agar al que se le realizaron algunas modificaciones las cuales consisten en incluir la solución de esporas directamente en el matraz con el medio a 40 – 45°C.

3.4.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

Se utiliza para evaluar la actividad antifúngica de una sustancia activa en un medio sólido mediante la formación de un halo inhibitorio.

3.4.1.1. Preparación de la solución de esporas.

Para elaborar ésta solución se preparó Infusión Cerebro Corazón pesando con una balanza analítica 7.4 gramos de la infusión que fueron agregados a un matraz con 200 ml de agua destilada, se tapó y se agitó para eliminar los grumos y se disolvió calentando al mechero hasta que rompiera a hervir agitando suavemente. Luego se tomó una probeta la cual se llenó hasta 50 ml de la infusión y se vació en cada frasco de dilución, se taparon los frascos y posterior a esto se introdujo a esterilizar en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se sacó, se dejó enfriar y se sembró el hongo tomando parte de la colonia con un asa de punta recta previamente esterilizada al mechero y se introdujeron al frasco con la infusión. Se le colocó la tapa a al frasco, se agitó muy bien para que se homogeneizara la mezcla, se identificó la muestra con el hongo contenido y se dejó incubar durante 20 días a temperatura ambiente.



Figura 2. Preparacion de infusión cerebro y corazón.



Figura 3. Elaboración de la suspensión de esporas.

3.4.1.2. Preparación de las placas para concentración al 100%

Se pesaron 11.7 gramos de PDA (Papa Dextrosa Agar) y se agregaron en 300 ml de agua destilada, se dejó hidratar y se agitó vigorosamente para eliminar los grumos, posterior a esto se calentó en un mechero agitando suavemente hasta que llegara al punto de hervor y se dejó hervir durante un minuto. Se esterilizó en autoclave por un periodo de 15 minutos a 15 libras de presión. Luego de ese tiempo, se sacó y se dejó enfriar a 45°C. De los frascos con la solución de esporas, Se tomó 1 ml con una pipeta estéril y se colocó en una caja Petri estéril vacía de 90 mm x 15 mm previamente identificada, inmediatamente se vaciaron aproximadamente 30 ml del medio PDA a la misma caja y se agitó suavemente y se dejó solidificar. Esto se realizó por cada hongo en 3 repeticiones, en condiciones asépticas. Luego se tomó una pipeta Pasteur, se esterilizó la base en el mechero, se dejó enfriar y se le hicieron 5 pozos de 8 mm en el agar.

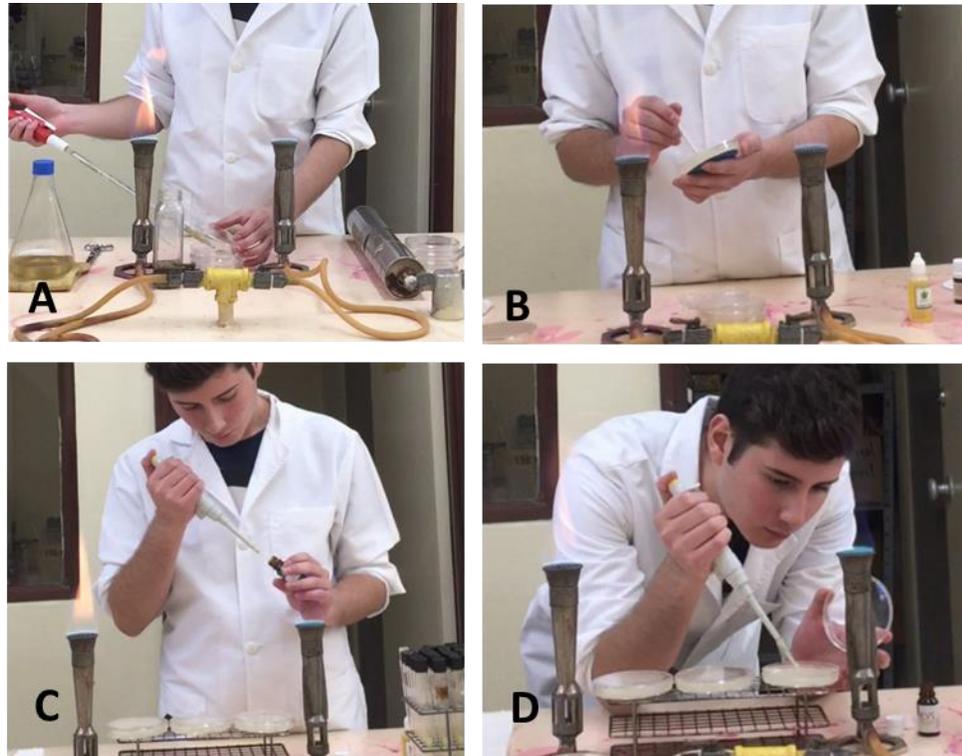


Figura 4. A, muestra adición de 1ml de suspensión de esporas a la caja Petri. B, realización de micropozos. C y D colocación del aceite esencial al 100%.

3.4.1.3. Preparación de las placas para concentraciones del 50 y 25%

Se utilizaron 3 matraces con 100 ml de agua destilada y se le agregó 3.9 gramos de PDA a cada uno. Se dejó hidratar y se agitó para deshacer los grumos, se calentaron al mechero y se dejó hervir por un minuto agitando suavemente. Se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, se retiró y se dejó enfriar a 40 - 45°C. Luego se tomó una pipeta estéril y se le añadió 1 ml de la solución de esporas al matraz correspondiente de cada hongo y se agitó. Cada matraz se vació en 3 cajas Petri estériles de 90 mm x 15 mm, se dejó solidificar y posteriormente se realizaron los pozos de la misma manera que en la concentración de 100%.

3.4.2. Inoculación del aceite a los pozos

Se tomó 0.1 ml de cada aceite esencial al 100% y se colocó en el pozo correspondiente de cada caja Petri con la ayuda de una micropipeta eppendorf. Esto se realizó en

condiciones asépticas. Se llevaron a incubación a temperatura ambiente por un periodo de 5 a 10 días dependiendo del crecimiento del hongo.

Para las concentraciones de 50 y 25% se utilizó aceite mineral estéril para bajar la concentración del aceite esencial y se mezclaron en viales estériles. Posteriormente se inocularon de la misma manera antes descrita en cada placa.

*** Se realizaron 3 repeticiones de cada muestra.**

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar lectura de acuerdo a la observación de las zonas claras de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros usando como unidad de medida los milímetros de estas zonas.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de los hongos por su análisis morfológico.

En la siguiente figura se observa el aspecto macroscópico y microscópico de los hongos que se utilizaron para el experimento.

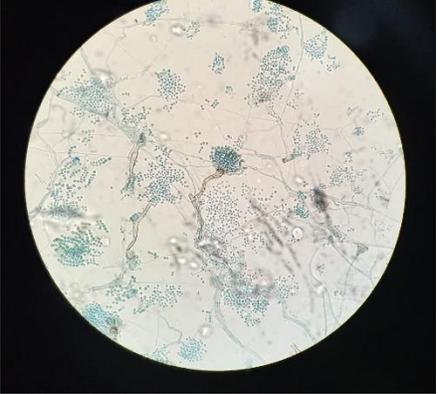
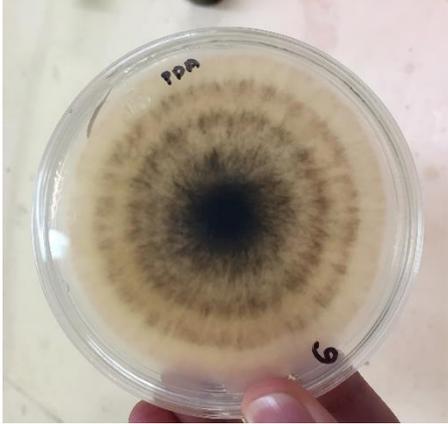
Hongo	Macroscópico	Microscópico
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>Curvularia lunata</i>		

Figura 5. Morfología de hongos

4.2. Determinación de la actividad antimicótica de acuerdo a la concentración.

Los resultados de cada aceite en concentración de 100% se utilizaron como indicativos para los aceites que tienen actividad antimicótica. Los aceites que no contaron con esa

actividad fueron descartados del experimento. Los resultados al 50 y 25% fueron reportados de acuerdo al diámetro del halo de inhibición en milímetros.

4.2.1. Resultados al 100%

Cuadro 1. Actividad antimicótica de los aceites. (R) Resistente, (M) Moderadamente sensible, (S) Sensible.

Hongo	Eucalipto (E)	Nuez (N)	Romero (R)	Tomillo (T)	Orégano (O)
<i>Aspergillus niger</i>	R	R	M	S	S
<i>Aspergillus flavus</i>	R	R	M	S	S
<i>Curvularia lunata</i>	R	R	M	S	S

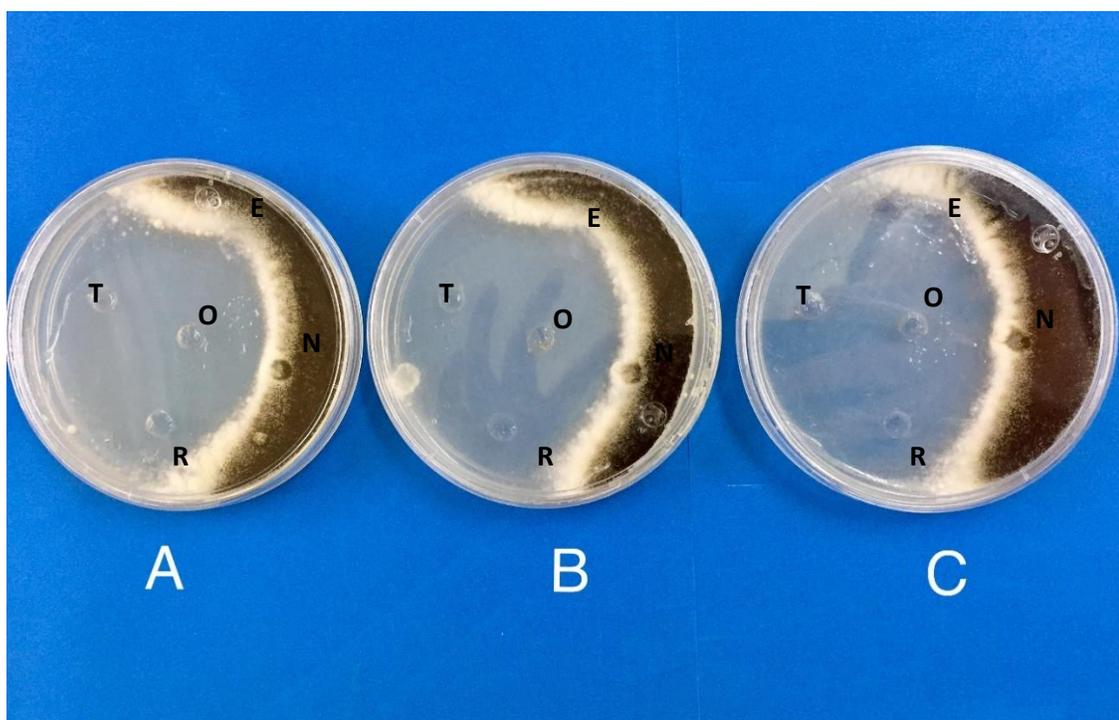


Figura 6. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para *Aspergillus niger*. (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

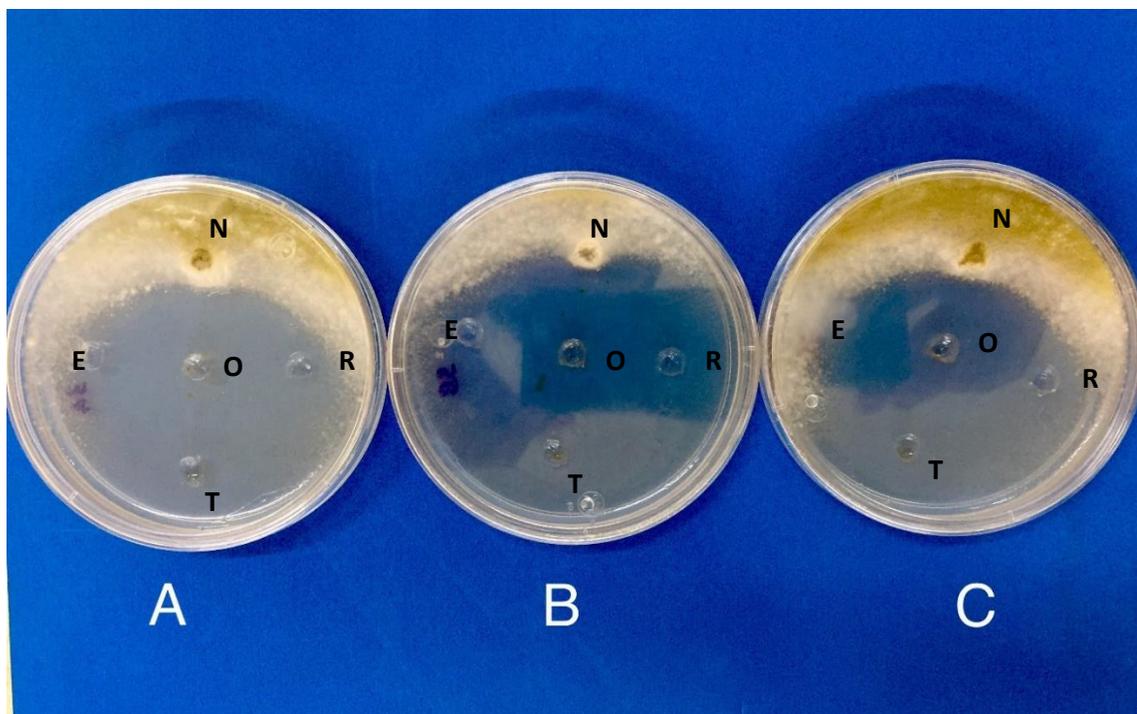


Figura 7. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para *Aspergillus flavus*. (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

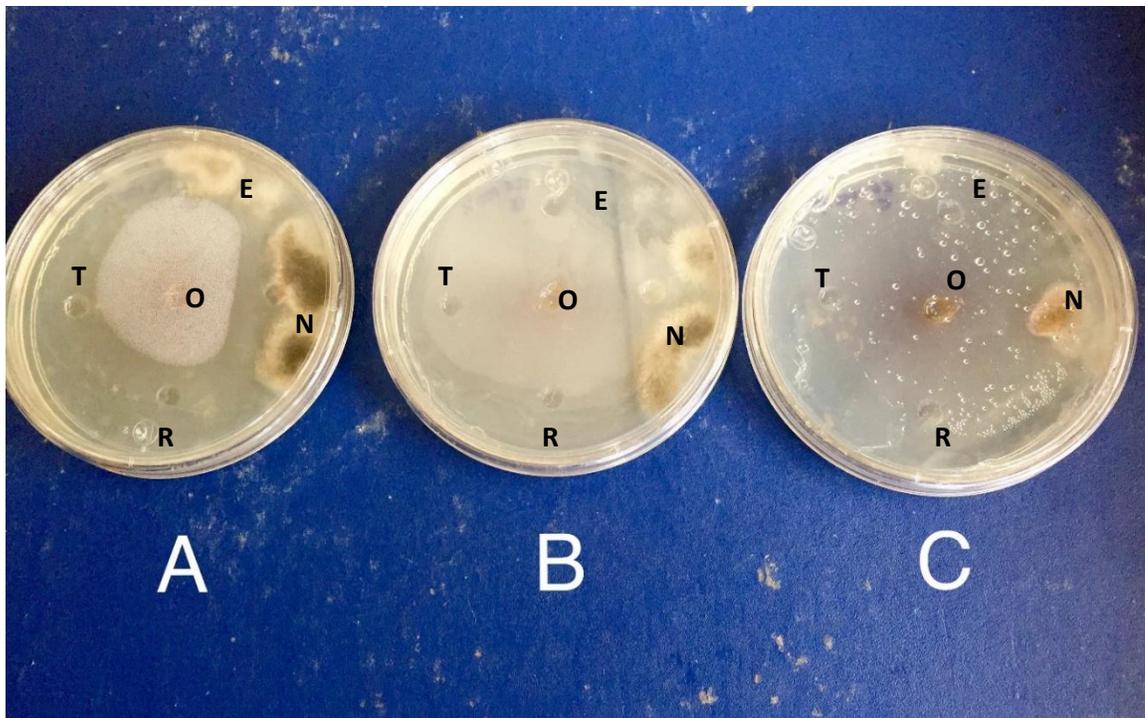


Figura 8. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 100% para *Curvularia lunata*. (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

*Los aceites de nuez y eucalipto fueron descartados a partir de esta parte debido a su negativa actividad como antimicótico en este experimento.

4.2.2. Resultados al 50%

Cuadro 2. Medida de halo inhibitorio de aceites en *A. niger*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	36
	Tomillo	26
	Romero	R
B	Orégano	32
	Tomillo	28
	Romero	R
C	Orégano	35
	Tomillo	29
	Romero	R

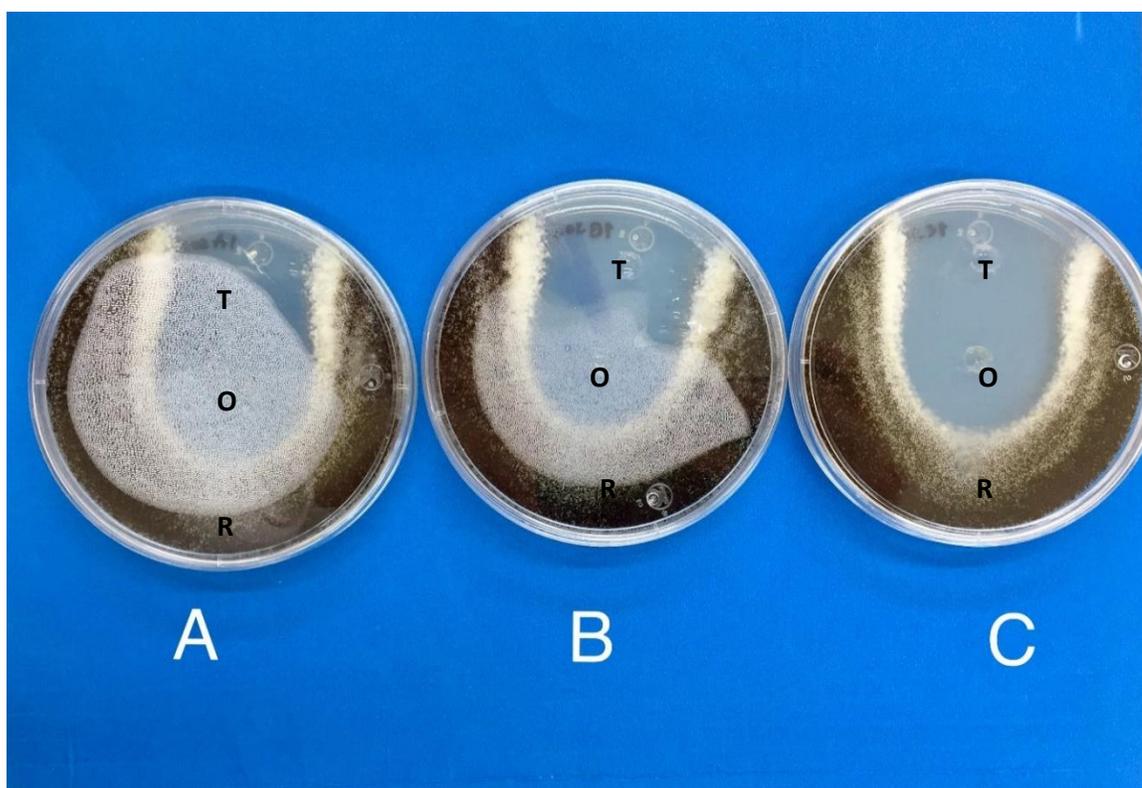


Figura 9. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para *Aspergillus niger*. (T) tomillo, (O) orégano, (R) romero. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

Cuadro 3. Medida del halo inhibitorio de los aceites en *A. flavus*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	11
	Tomillo	18
	Romero	R
B	Orégano	21
	Tomillo	19
	Romero	R
C	Orégano	22
	Tomillo	25
	Romero	R

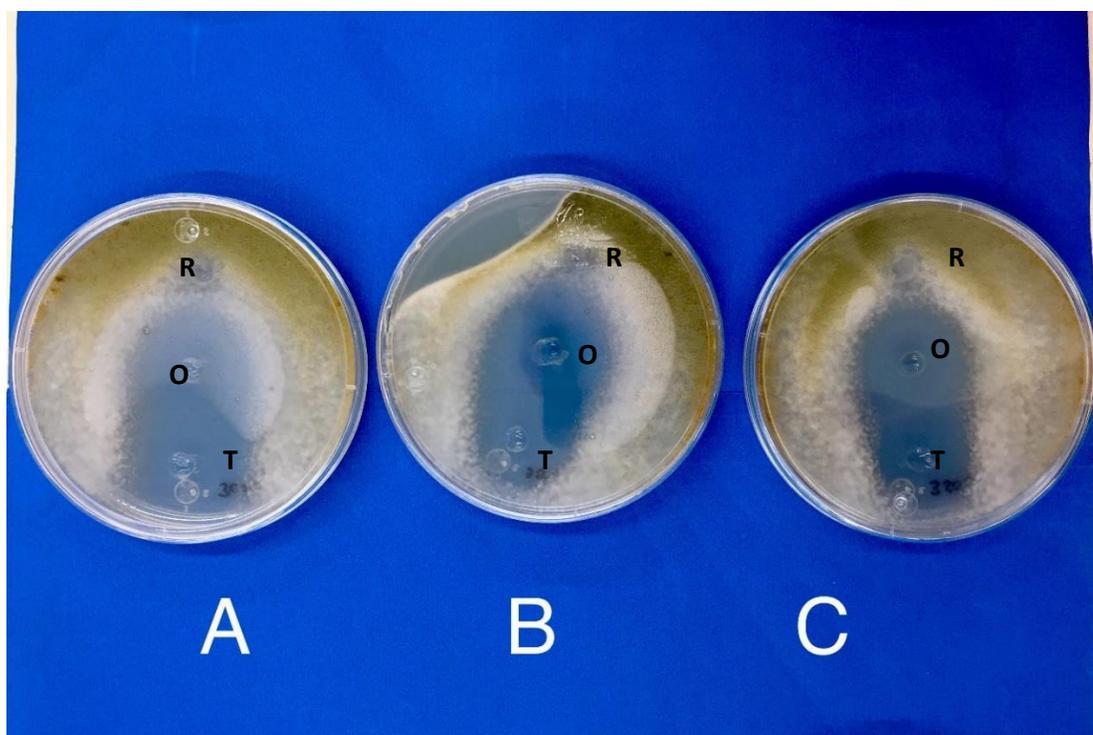


Figura 10. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para *Aspergillus flavus*. (E) eucalipto, (N) nuez, (R) romero, (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

Cuadro 4. Medida del halo inhibitorio en aceites en *C. lunata*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	39
	Tomillo	29
	Romero	R
B	Orégano	45
	Tomillo	39
	Romero	R
C	Orégano	38
	Tomillo	34
	Romero	R

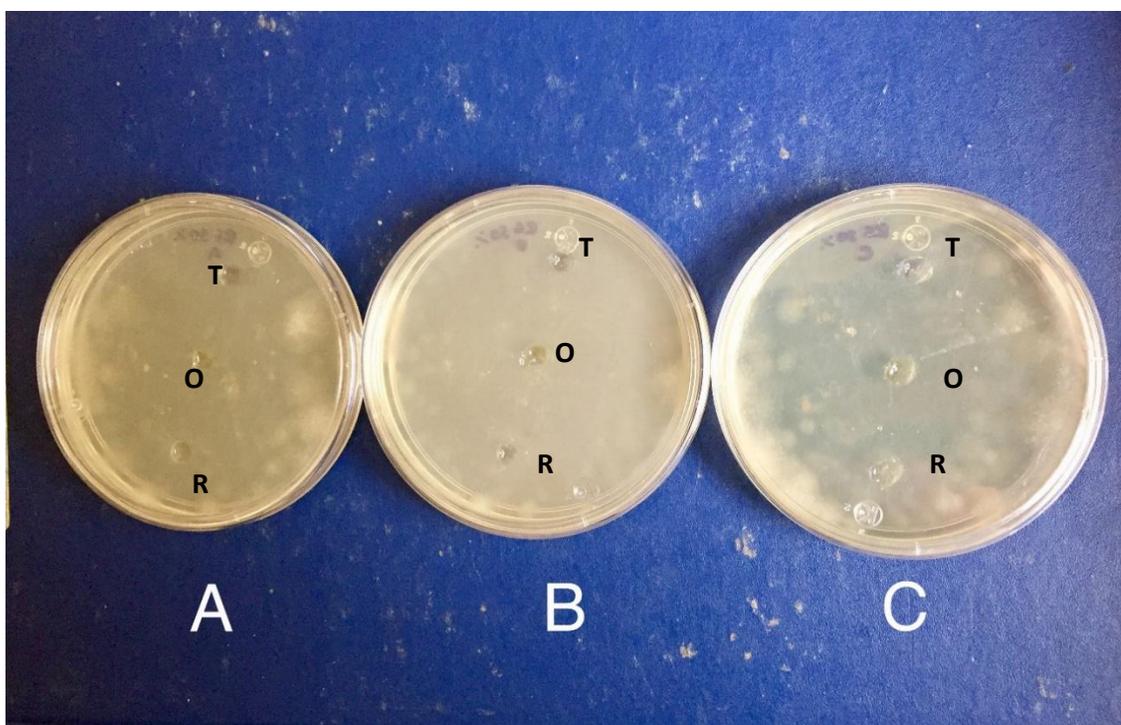


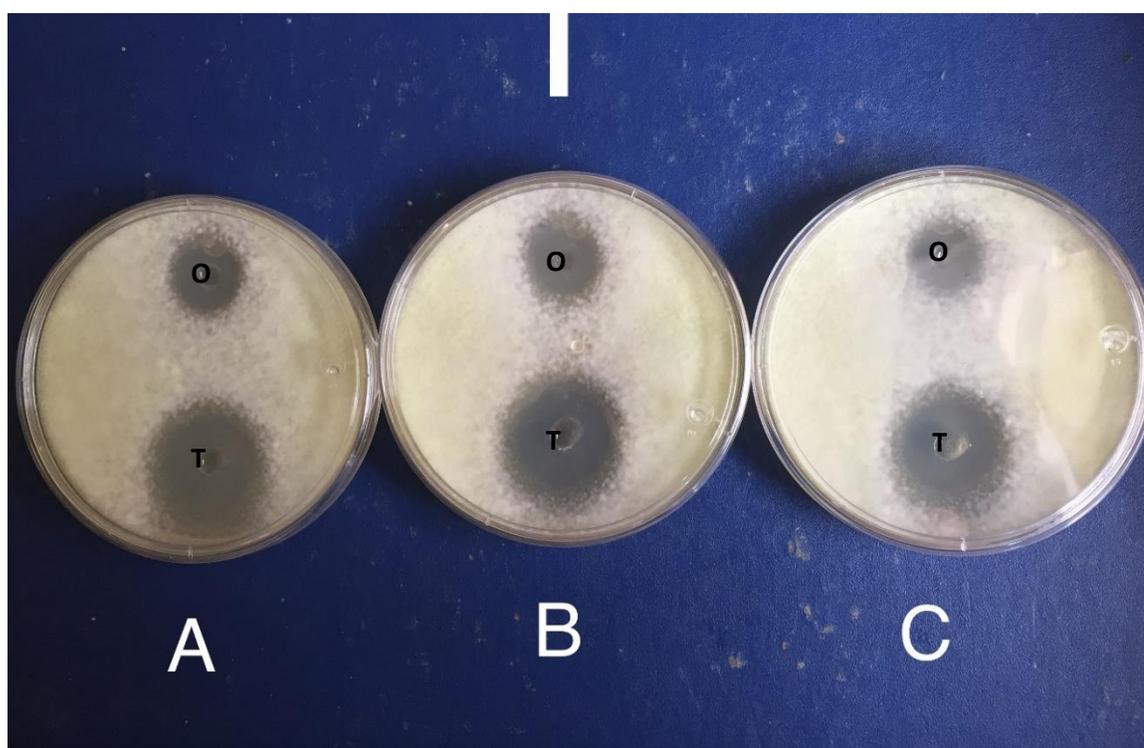
Figura 11. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 50% para *Curvularia lunata*. (T) tomillo, (O) orégano, (R) romero. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

El aceite de romero fue descartado a partir de aquí debido a que no mostro actividad antimicótica en la concentración del 50%.

4.2.3. Resultados al 25%

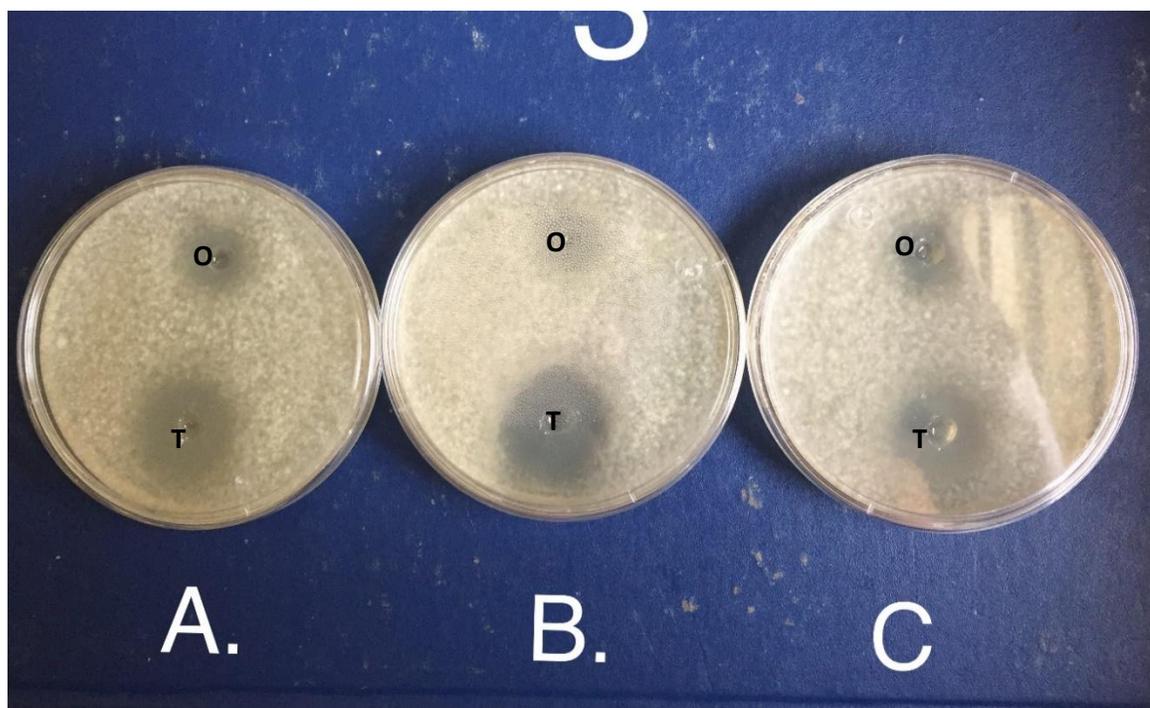
Cuadro 5. Medida del halo de inhibición de los aceites en *A. niger*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	19
	tomillo	24
B	Orégano	18
	Tomillo	24
C	Orégano	16
	Tomillo	21

**Figura 12.** Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para *Aspergillus niger*. (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

Cuadro 6. Medida del halo de inhibición de los aceites en *A. flavus*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	11
	tomillo	22
B	Orégano	12
	Tomillo	24
C	Orégano	14
	Tomillo	21

**Figura 13.** Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para *Aspergillus flavus*. (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.**Cuadro 7.** Medida del halo de inhibición de los aceites en *C. lunata*.

Muestra	Aceite	Diámetro (mm)
A	Orégano	32
	tomillo	17
B	Orégano	31
	Tomillo	19
C	Orégano	29
	Tomillo	18

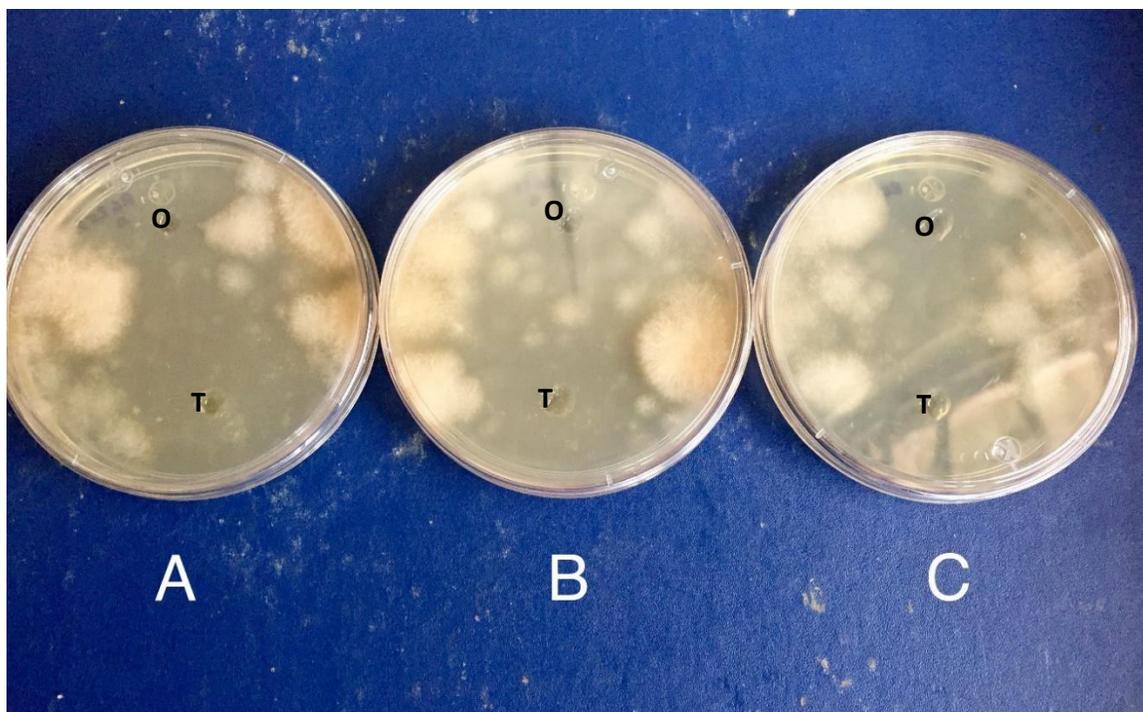


Figura 14. Resultados de la actividad antimicótica de los aceites a concentración de 25% para *Curvularia lunata*. (T) tomillo, (O) orégano. Las letras A, B, C corresponden a las repeticiones.

5. DISCUSIÓN

Existen numerosas investigaciones acerca de las propiedades principalmente como antimicrobianos de algunos aceites esenciales contra microorganismos considerados como patógenos que afectan humanos, animales, plantas e incluso algunos que tengan relación con la contaminación de alimentos.

En el presente estudio, fue únicamente de interés el efecto antimicótico de los aceites. Quedó demostrado que los efectos antimicóticos de los aceites de tomillo y orégano son los más potentes, estos pueden ser que se deba a que los mayores componentes sean timol y carvacol.

De acuerdo con lo que demuestra Mekonnen *et al.* (2016) en su investigación, el efecto del aceite de romero es muy leve, ya que como se muestra en el experimento, solo fue efectivo a concentraciones del 100% siendo aun así muy débil. Mientras que el aceite de eucalipto, contrario a lo que dice Miyamoto *et al.* (2009) no presentó actividad antimicótica ni en concentración de 100% para ningún hongo.

El aceite de nuez, al igual del eucalipto, presentó un efecto nulo de acción antimicótica, incluso como se muestra en la **Figura 6** la colonia bien desarrollada y de manera precoz, podría ser un indicativo de que el aceite de nuez puede potencializar el crecimiento y desarrollo del hongo.

Estos resultados probablemente son debido a la existencia de diferentes componentes y concentraciones de los activos compuestos presentes en los aceites esenciales de diferentes especies.

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- Algunos aceites esenciales si pueden ser utilizados como una alternativa natural como antimicóticos.
- Los aceites esenciales que mayor efecto tuvieron a distintas concentraciones fueron tomillo y orégano.
- El aceite de romero solo posee efecto antimicótico para los tres hongos utilizados a concentración de 100%.
- El aceite de nuez y de eucalipto que se probaron en este trabajo, no tienen ningún efecto antimicótico contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* ni *Curvularia lunata*.
- En las concentraciones de los aceites de orégano, tomillo y romero al 50% en *Aspergillus niger*, el aceite de orégano es el que más potente tiene su acción antimicótica, mientras que el romero no tiene acción. En *Aspergillus flavus* el promedio del halo de inhibición comprueba que el aceite más potente es el de tomillo, el de romero tampoco tuvo actividad en este hongo. En *Curvularia lunata*, el aceite de orégano es el que tuvo mayor efecto, mientras que el de romero se mostró sin efecto.
- Los resultados de las concentraciones de 25% en los aceites, indican que en *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, el más potente fue el de tomillo mientras que en *Curvularia lunata*, fue el de orégano el que tuvo mayor actividad.

7. LITERATURA CITADA

- Akbari, J., M. Saeedi, D. Farzin, K. Morteza-Semnani y Z. Esmaili (2015). "Transdermal absorption enhancing effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* on percutaneous absorption of Na diclofenac from topical gel." Pharmaceutical biology 53(10): 1442-1447.
- Alcalá-Marcos, K. M., A. G. Alvarado-Gamarra, L. A. Alejandro-Paredes y E. Huayané-Linares (2011). "ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) COMPARADO CON EL FLUCONAZOLEN CULTIVO DE *Candida albicans*." CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana 16(2): 83-86.
- Asdadi, A., A. Hamdouch, A. Oukacha, R. Moutaj, S. Gharby, H. Harhar, M. El Hadek, B. Chebli y L. M. Idrissi Hassani (2015). "Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections." Journal de mycologie medicale 25(4): e118-127.
- Baptista, E. B., D. C. Zimmermann-Franco, A. A. Lataliza y N. R. Raposo (2015). "Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Eucalyptus smithii* against dermatophytes." Rev Soc Bras Med Trop 48(6): 746-752.
- Belleste, B., H. Raberin, P. Flori, S. El Akssi, R. Tran Manh Sung, M. Taourirte y J. Hafid (2012). "Antifungal effect of the essential oil of *Thymus broussonetii* Boiss endogenous species of Morocco." Natural product research 26(18): 1692-1696.
- Ben Hassine, D., M. Abderrabba, Y. Yvon, A. Lebrihi, F. Mathieu, F. Coudercy J. Bouajila (2012). "Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts." Molecules 17(8): 9540-9558.
- Cermelli, C., A. Fabio, G. Fabio y P. Quaglio (2008). "Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses." Current microbiology 56(1): 89-92.
- Cobellis, G., Z. Yu, C. Forte, G. Acuti y M. Trabalza-Marinucci (2016). "Dietary supplementation of *Rosmarinus officinalis* L. leaves in sheep affects the abundance of rumen methanogens and other microbial populations." Journal of animal science and biotechnology 7: 27.
- da Silva Bomfim, N., L. P. Nakassugi, J. Faggion Pinheiro Oliveira, C. Y. Kohiyama, S. A. Mossini, R. Grespan, S. B. Nerilo, C. A. Mallmann, B. Alves Abreu Filho y M. Machinski, Jr. (2015). "Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg." Food chemistry 166: 330-336.
- de Lira Mota, K. S., F. de Oliveira Pereira, W. A. de Oliveira, I. O. Lima y E. de Oliveira Lima (2012). "Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol." Molecules 17(12): 14418-14433.
- Elaissi, A., Z. Rouis, N. A. Salem, S. Mabrouk, Y. ben Salem, K. B. Salah, M. Aouni, F. Farhat, R. Chemli, F. Harzallah-Skhiri y M. L. Khouja (2012). "Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities." BMC complementary and alternative medicine 12: 81.
- Esmaili, D., A. M. Mobarez y A. Tohidpour (2012). "Anti-helicobacter pylori activities of shoya powder and essential oils of *thymus vulgaris* and *eucalyptus globulus*." The open microbiology journal 6: 65-69.
- Giordani, R., P. Regli, J. Kaloustian, C. Mikail, L. Abou y H. Portugal (2004). "Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of

- amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*." Phytotherapy research : PTR 18(12): 990-995.
- Gomez-Sanchez, A., E. Palou y A. Lopez-Malo (2011). "Antifungal activity evaluation of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* by gaseous contact." Journal of food protection 74(12): 2192-2198.
- Hernández, T., M. Canales, A. M. García, Á. Duran, S. Meráz, P. Dávila y J. G. Ávila (2008). "Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 7(4): 202-206.
- Lara, V. M., A. B. Carregaro, D. F. Santurio, M. F. de Sa, J. M. Santurio y S. H. Alves (2016). "Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Strains Isolated from *Alouatta* spp. Feces to Essential Oils." Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2016: 1643762.
- Martins, C., T. Natal-da-Luz, J. P. Sousa, M. J. Goncalves, L. Salgueiro y C. Canhoto (2013). "Effects of essential oils from *Eucalyptus globulus* leaves on soil organisms involved in leaf degradation." PloS one 8(4): e61233.
- Mekonnen, A., B. Yitayew, A. Tesema y S. Taddese (2016). "In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*." Int J Microbiol 2016: 9545693.
- Miyamoto, C. T., J. R. Sant'Anna, C. C. Franco, M. M. Cunico, O. G. Miguel, L. C. Cocco, C. I. Yamamoto, C. Correa, Jr. y M. A. Castro-Prado (2009). "Genotoxic activity of *Eucalyptus globulus* essential oil in *Aspergillus nidulans* diploid cells." Folia microbiologica 54(6): 493-498.
- Nasir, M., K. Tafess y D. Abate (2015). "Antimicrobial potential of the Ethiopian *Thymus schimperi* essential oil in comparison with others against certain fungal and bacterial species." BMC complementary and alternative medicine 15: 260.
- Panahi, Y., M. Sattari, A. Pour Babaie, F. Bei raghdar, R. Ranjbar, A. Hedaiat Joo y M. Bigdeli (2011). "The Essential Oils Activity of *Eucalyptus polycarpa*, *E. largiflorence*, *E. malliadora* and *E. camaldulensis* on *Staphylococcus aureus*." Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR 10(1): 43-48.
- Perina, F. J., D. C. Amaral, R. S. Fernandes, C. R. Labory, G. A. Teixeira y E. Alves (2015). "*Thymus vulgaris* essential oil and thymol against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler: effects on growth, viability, early infection and cellular mode of action." Pest management science 71(10): 1371-1378.
- Pinto, E., C. Pina-Vaz, L. Salgueiro, M. J. Goncalves, S. Costa-de-Oliveira, C. Cavaleiro, A. Palmeira, A. Rodrigues y J. Martinez-de-Oliveira (2006). "Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species." Journal of medical microbiology 55(Pt 10): 1367-1373.
- Portillo-Ruiz, M. C., R. A. Sanchez, S. V. Ramos, J. V. Munoz y G. V. Nevarez-Moorillon (2012). "Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium." Journal of food science 77(8): M441-445.
- Radaelli, M., B. P. da Silva, L. Weidlich, L. Hoehne, A. Flach, L. A. da Costa y E. M. Ethur (2016). "Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*." Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 47(2): 424-430.
- Reyes-Jurado, F., A. Lopez-Malo y E. Palou (2016). "Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria." Journal of food protection 79(2): 309-315.

- Rodriguez-Garcia, I., M. R. Cruz-Valenzuela, B. A. Silva-Espinoza, G. A. Gonzalez-Aguilar, E. Moctezuma, M. M. Gutierrez-Pacheco, M. R. Tapia-Rodriguez, L. A. Ortega-Ramirez y J. F. Ayala-Zavala (2015). "Oregano (*Lippia graveolens*) essential oil added within pectin edible coatings prevents fungal decay and increases the antioxidant capacity of treated tomatoes." Journal of the science of food and agriculture.
- Rojas, R., B. Bustamante, J. Bauer, I. Fernández, J. Albán y O. Lock (2003). "Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants." Journal of ethnopharmacology 88(2–3): 199-204.
- Sadeh, D., N. Nitzan, A. Shachter, D. Chaimovitch, N. Dudai y M. Ghanim (2017). "Whitefly attraction to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is associated with volatile composition and quantity." PloS one 12(5): e0177483.
- Salgueiro, L. R., C. Cavaleiro, M. J. Goncalves y A. Proenca da Cunha (2003). "Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala." Planta medica 69(1): 80-83.
- Sampietro, D. A., E. F. Lizarraga, Z. A. Ibatayev, A. B. Omarova, Y. M. Suleimen y C. A. Catalan (2016). "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Acantholippia deserticola*, *Artemisia proceriformis*, *Achillea micrantha* and *Libanotis buchtormensis* against phytopathogenic bacteria and fungi." Natural product research 30(17): 1950-1955.
- Satyal, P., T. H. Jones, E. M. Lopez, R. L. McFeeters, N. A. Ali, I. Mansi, A. G. Al-Kaf y W. N. Setzer (2017). "Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*." Foods 6(3).
- Scazzocchio, F., S. Garzoli, C. Conti, C. Leone, C. Renaioli, F. Pepi y L. Angiolella (2016). "Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity." Natural product research 30(17): 1909-1918.
- Sienkiewicz, M., M. Lysakowska, M. Pastuszka, W. Bienias y E. Kowalczyk (2013). "The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents." Molecules 18(8): 9334-9351.
- Sokovic, M. D., J. Vukojevic, P. D. Marin, D. D. Brkic, V. Vajs y L. J. van Griensven (2009). "Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities." Molecules 14(1): 238-249.
- Tyagi, A. K., D. Bukvicki, D. Gottardi, G. Tabanelli, C. Montanari, A. Malik y M. E. Guerzoni (2014). "Eucalyptus essential oil as a natural food preservative: in vivo and in vitro antiyeast potential." Biomed Res Int 2014: 969143.
- Vale-Silva, L. A., M. J. Goncalves, C. Cavaleiro, L. Salgueiro y E. Pinto (2010). "Antifungal activity of the essential oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species." Planta medica 76(9): 882-888.
- Velásquez, M. A., R. M. Álvarez, P. J. Tamayo y C. P. Carvalho (2014). "Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp." Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 1: 7-14.
- Wang, W., N. Li, M. Luo, Y. Zu y T. Efferth (2012). "Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components." Molecules 17(3): 2704-2713.
- Yousefzadi, M., A. Riahi-Madvar, J. Hadian, F. Rezaee, R. Rafiee y M. Biniiaz (2014). "Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: in vitro cytotoxicity and anti-microbial activity." Journal of immunotoxicology 11(1): 50-55.

Zheljazkov, V. D., T. Astatkie, I. Zhalnov y T. D. Georgieva (2015). "Method for attaining rosemary essential oil with differential composition from dried or fresh material." Journal of oleo science 64(5): 485-496.

Zouhir, A., T. Jridi, A. Nefzi, J. Ben Hamida y K. Sebei (2016). "Inhibition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by antimicrobial peptides (AMPs) and plant essential oils." Pharmaceutical biology: 1-15.