

Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia)

Yáñez Rueda Xiomara ¹., Cuadro Mogollón Omar Fernando ¹

¹Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona, Extensión Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

Resumen

La utilización de aceites esenciales (AE) para combatir bacterias que pueden afectar al hombre resulta una alternativa eficaz, económica y de menor impacto ambiental que la utilización de compuestos químicos sintéticos. Por medio de este estudio se quiere determinar cuál de las dos especies en estudio y que método de extracción del aceite es el más adecuado para obtener un efecto antibacteriano que garantice la eliminación de las bacterias de interés alimentario seleccionadas. Con la finalidad de lograr este objetivo se procesaron hojas secas y hojas frescas de las especies de *Eucalyptus* seleccionadas en tres zonas del municipio de Pamplona y el AE se obtuvo por dos métodos de extracción: Arrastre con vapor (AV) e hidrodestilación asistida por radiación de microondas (HDMO), obteniendo el mejor rendimiento (4%) a partir de hojas secas de *E. globulus* recolectadas en la zona 2, por el método AV. Al evaluar el efecto antibacterial de los aceites de las especies *E. globulus* y *E. camaldulensis* se encontró actividad frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*. Utilizando la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (GCAR) se identificaron doce componentes mayoritarios: 1,8-Cineol o Eucaliptol (77-82%), α -Pineno, Limoneno, α -Terpineno, α -Copaeno, Guaiol, α -Felandreno, β -Terpinen-4-ol, Linalol, α -Terpineol, Mirceno y β -Selineno. Por medio de las técnicas de difusión en disco y microdilución en caldo se pudo evidenciar que el AE extraído a partir de hojas secas, Zona 2, de *E. globulus* es el que mayor efecto antibacterial presenta obteniéndose menores Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) frente a las bacterias Gram-positivas.

Palabras Clave: Actividad antibacteriana, aceite esencial, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*.

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* of three zones of Pamplona (Colombia)

Abstract

The use of essential oils (EO) to fight bacteria that can infect humans is an effective alternative, less economic and environmental impact than the use of synthetic chemicals. Through this study it is to determine which of the two species under study and the oil extraction method is most suitable to obtain an antibacterial effect to ensure the removal of bacteria selected food interest. In order to achieve this goal, processed dried leaves and fresh leaves of selected *Eucalyptus* species in three areas of the city of Pamplona and the AE was obtained by two extraction methods: steam distillation (AV) and radiation-assisted Microwave Hydrodistillation (MWHd), obtaining the best performance (4%) from the dried leaves of *E. globulus* collected in zone 2, by the AV method. The antibacterial effect of the oils of the species *E. globulus* and *E. camaldulensis* activity was found against strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis*. Using the technique of Gas Chromatography High Resolution (HRGC) identified twelve major components: 1,8-Cineole or Eucalyptol (77-82%), α -Pinene, Limonene, α -Terpinene, α -Copaene, Guaiol, α -Phellandrene, β -Terpinen-4-ol, Linalool, α -Terpineol, Myrcene and β -Selinene. Through the

53

techniques of disc diffusion and broth microdilution was evident that the EO extracted from dried leaves of *E. globulus*, zone 2, is the greatest antibacterial effect presents, giving lower MIC against Gram-positive bacteria.

Key Words: Antibacterial Activity, Essential Oil, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*

Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e *E. camaldulensis* três áreas de Pamplona (Colômbia)

Resumo

O uso de óleos essenciais (AE) para combater as bactérias que podem afectar o ser humano é um impacto eficaz, económica e ambiental menor do que o uso de produtos químicos sintéticos. Através deste estudo é determinar qual das duas espécies em estudo e que o método de extração do óleo é mais adequada para um efeito antibacteriano, que garante a eliminação das bactérias do alimento interesse seleccionado. Para alcançar este objetivo e folhas secas foram processadas folhas frescas de espécies de *Eucalyptus* seleccionados três zonas município de Pamplona e do AE foi obtida por dois métodos de extração: Vapor (AV) e radiação de microondas assistida hidrodestilação (HDMO), obtendo o melhor desempenho (4%) de folhas secas de *E. globulus* recolhidos na zona 2, o método de AV. Ao avaliar o efeito antibacteriano de óleos espécie *E. globulus* encontradas cepas *camaldulensis* ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Usando a técnica de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (GCAR) identificou 12 componentes principais: 1,8-cineol ou eucaliptol (77-82%), α -pineno, limoneno, α -terpineno, α -copaeno, guaiol, α -felandreno, β -Terpinen-4-ol, linalol, α -terpineol, β -mirceno e selineno. Usando as técnicas de disco difusão e microdiluição em caldo era evidente que a AE extraído de folhas secas, Zona 2, *E. globulus* é o maior efeito antibacteriano obteve menor concentração inibitória mínima (CIM) contra bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, óleo essencial, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus camaldulensis*.

*Para citar este artículo: Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Yáñez Rueda X, Cuadro Mogollón OF. Bistua:Revista de la facultad de Ciencias Básicas.2012.10(1):52-61

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Xiomara Yáñez Rueda. Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona, Extensión Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.
email:xyrquim@unipamplona.edu.co

Recibido: Mayo 12 de 2011 Aceptado: Enero 30 de 2012

Introducción

El interés mundial en la biopreservación de los sistemas alimentarios ha aumentado a causa de los grandes costos generados por el deterioro y las intoxicaciones alimentarias generadas por agentes patógenos presentes en los alimentos(1-3). Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y perfumería, así como también para dar sabor y conservar una gran variedad de productos alimenticios (4-9)

Con el aumento de la resistencia de patógenos al ser utilizados antibacterianos sintéticos y la tendencia actual por parte de los consumidores de no adquirir productos con este tipo de compuestos, se ha generado un interés considerable en la investigación de los AE como agentes antimicrobianos y sus aplicaciones potenciales en los alimentos. A pesar de haberse estudiado el efecto antimicrobiano de los AE, hoy en día poco se conoce sobre la acción de sus componentes sobre las células bacterianas. Teniendo en cuenta que un AE está conformado por un número amplio de compuestos químicos, lo más probable es que su acción antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a una sinergia entre todos los componentes. Una característica importante que presentan los AE es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana de la célula bacteriana, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula. Básicamente el efecto antimicrobiano que ejerce un AE se debe a su efecto a nivel de la perturbación de la membrana citoplasmática, la alteración de la fuerza motriz de protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y

membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis (2). En general, el efecto antimicrobiano se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (10,11).El propósito del presente estudio fue evaluar por medio de dos técnicas diferentes, el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis*, frente a cinco cepas seleccionadas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*.

Materiales y Metodos

Selección de la Materia Prima Vegetal

Las hojas se recolectaron en tres (3) zonas del municipio de Pamplona, el cual está situado en las coordenadas 72°65' de longitud al oeste de Greenwich y a 7° y 37' de latitud norte, a 2.287 metros sobre el nivel del mar (msnm), presentando una temperatura promedio de 16 °C. En cada zona se delimitó una parcela de 10x10 m, bajo la supervisión del Botánico Luis Roberto Sánchez Montaña, adscrito al departamento de Biología y Química de la Universidad de Pamplona, quien también identificó las especies, las cuales tienen los siguientes números de colección en el Herbario Regional Catatumbo-Sarare: OMFC01 para *Eucalyptus globulus* y OFCM02 para *E. camaldulensis*.

Las zonas seleccionadas fueron (Figura 1):

Zona 1 (Z1): Suroriente de la vereda Sabaneta, en las coordenadas: Latitud 7° 28' Norte, Longitud 72° 73' Oeste, 2895 msnm.

Zona 2 (Z2): Sureste de la vereda el Naranjo, en las coordenadas: Latitud 7° 23' Norte, Longitud 72°63' Oeste 2504 msnm.

Zona 3 (Z3): Oeste de la vereda Cunubá, en las coordenadas: Latitud 7° 37'

55

Norte, Longitud 72° 67' Oeste, 2737 msnm.

Las hojas se llevaron al laboratorio del Grupo Productos Verdes (GPV), en Villa del Rosario, para ser procesadas inicialmente como hojas frescas (HF) y luego de un lapso de 15 días de almacenamiento en lugar fresco y aireado, como hojas secas (HS).

Obtención del AE y medición del rendimiento: Para la extracción de los AE se emplearon las técnicas de destilación por Arrastre con Vapor de agua (AV) e Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (HDMO). En el primer caso se empleó un equipo de hidrodestilación con manta de calentamiento para un balón de 4 l. Se pesaron 400 g de material vegetal en el caso de hoja fresca (HF) y 700 g en el caso de hoja seca (HS), los cuales fueron introducidos en el balón y se adicionaron 2 l de agua. El tiempo de extracción fue de 2 ½ h (12). La segunda técnica se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo Clevenger, con un reservorio de destilación Dean-Stark y la adaptación a un horno microondas convencional marca SAMSUNG, modelo mw840wa, con potencia de salida de 800 W y frecuencia de radiación de 2.5 GHz. Cada extracción duró 35 min, en ciclos de 15, 10 y 10 minutos (13).

Las muestras de AE se secaron con Na₂SO₄, con el fin de eliminar el agua residual y preparar la muestra para el análisis cromatográfico. Se guardaron en frasco ámbar, manteniéndolas refrigeradas a 4 °C. El rendimiento de cada AE se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left[\frac{ml \text{ ae}}{W \text{ mv}} \right] \times 100$$

Donde: ml_{AE}: mililitros del aceite esencial (ml) y W_{MV}: Peso del material vegetal (g).

Análisis Químico por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR):

Se tomaron 30 µl del aceite y se aforaron a 1 ml con diclorometano. Para el análisis por CGAR-FID (Flame Ionization Detector) se utilizó un equipo marca Agilent Technologies 6890A Series II Hewlet-Packard. Flujos de aire y de hidrógeno para el detector FID de 400 y 40 mL/min. Se inyectó 1.0 µl, modo split (10:1) y se utilizó una columna apolar HP-5 de (60 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 µm), fase estacionaria de 5% fenilpolidimetilsiloxano. Temperatura inicial 50°C por 4 min y se programó en 3 °C/min hasta 300 °C. Gas de arrastre Helio, presión de entrada 20.02 psi, velocidad lineal 21 cm/seg, presión del gas en el inyector de 200 kPa. Velocidad lineal de 1 ml/min. Temperatura del inyector 250 °C. La composición porcentual de cada componente se determinó por el método de normalización de las áreas de cada pico sin usar factores de corrección. Para la identificación de cada componente se empleó el índice de retención de Kováts (I_k). Estos se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₈ hasta C₃₂.

Para el análisis CGAR-EM se utilizó un equipo HP 6890 Series, en interfase con detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2005. Se inyectó 1.0 µL, modo split (10:1), flujo 10 ml/min. Temperatura del inyector 250 °C.

Columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m de espesor). Helio (99.995%, Aga-Fano) como gas de arrastre, presión del gas 150 pKa, flujo constante de 1 ml/min y velocidad lineal de 36 cm/seg. Temperatura inicial 50 °C por 4 minutos. La temperatura de la cámara de ionización y la línea de transferencia de 180 y 280 °C, respectivamente. La energía de la fuente de electrones de 70 eV. Los espectros de masas (EM) fueron obtenidos por ionización electrónica, barrido automático en el rango de masas m/z 50-550 u.m.a., a 2.4 scan/s. Cada EM se comparó con los estándares reportados en la base de datos NIST- 2005 y con datos reportados en la literatura (14).

Cepas Bacterianas: Las bacterias *Staphylococcus aureus* TCC 29213 Gram (+), *Escherichia coli* ATCC 25922 Gram (-), *Salmonella enteritidis* ATCC 17036 Gram (-), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Gram (+) y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 Gram (+), de la American Type Culture Collection (USA), en estado liofilizado, fueron reactivados en caldo BHI e incubados por 18 h a 35 +/- 2°C.

Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales (AE): Se determinaron la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en placa y la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) por microdilución en caldo, los cuales fueron llevados a cabo teniendo en cuenta los estándares de la NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) M2-A7 y NCCLS M 27-A2 respectivamente (15)

Método de Difusión en Disco: Una suspensión de la bacteria en estudio se

inoculó sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton y posteriormente se colocó sobre la placa los discos de papel de filtro impregnados con concentraciones de 20–100 % del AE. Luego del período de incubación de 18 a 24 h, a una temperatura de 35+/-2 °C, se midió el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos.

Método de Microdilución en caldo: Se utilizó el caldo Muller-Hinton en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pozos previa determinación del patrón McFarland 0,5 equivalente 10^8 ufc/ml frente a las concentraciones 45-100 % del AE. Se usaron micropipetas y puntas estériles. Incubadora a 35 +/- 2 °C y cabina de flujo laminar. El lapso de tiempo de incubación es de 18 a 24 h.

Discusión de resultados

Los AE extraídos de las hojas de *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* tienen un olor penetrante característico y un color amarillo claro. Se caracterizan por presentar densidades muy similares, entre 0.90-0.93 g/mL y también índices de refracción parecidos, entre 1.37–1.50, los cuales coinciden con los reportados en la literatura(16).

La identificación de los componentes mayoritarios de cada aceite esencial (AE) y sus concentraciones relativas se muestran en la Tabla 1 para *E. globulus* y en la Tabla 2 para *E. camaldulensis*, respectivamente. Se puede concluir que para las dos especies estudiadas, se observa el mismo *quimiotipo* en las 3 zonas de recolección. En cada especie de eucalipto, doce (12) de los principales componentes fueron plenamente identificados y representan el 99,6 % y

95.5% respectivamente, de la composición total del AE.

El componente mayoritario para *E. globulus* fue el 1,8-Cineol o Eucaliptol (82,27%), seguido de Limoneno (3,70%), α -Pinenos (3,16%), Gualol (2,76%), Terpinen-4-ol (1,4%), Linalol (1,3%), α -Terpineol (1,2%), β -Mirceno (1,12%) y α -Terpineno (1,1%). Mientras que para *E. camaldulensis* el componente mayoritario, el 1,8-Cineol estuvo en menor concentración (77,41%), seguido por la presencia de Terpinen-4-ol (3,68%), α -Pinenos (3,64%), Limoneno (3,21%), α -Terpineno (2,31%), α -Terpineol (1,95%), β -Mirceno (1,41%) y α -Copaeno (1,4%). La Food Chemicals Codex en los Estados Unidos regula la utilización de aceite de eucalipto rico en 1, 8-Cineol o Eucaliptol (17) como agente saborizante y conservante en alimentos, estipulando la presencia de no menos de 70 % de Cineol en el aceite esencial extraído (18), de esta manera los extractos de plantas naturales son prometedores herramientas para contrarrestar los microorganismos patógenos en la industria de alimentos y farmacéutica (19-22)

En general, los metabolitos secundarios volátiles identificados en los AE de *E. globulus* y *E. camaldulensis*, empleando las diferentes técnicas de extracción, cambiaron ligeramente en sus respectivas concentraciones. La variabilidad en los porcentajes de los componentes químicos, pudo estar influenciado por diversos factores, tales como, la técnica de extracción (arrastre con vapor o hidrodestilación asistida por microndas), el tratamiento de la hoja (fresca o seca), las condiciones del suelo

y la edad de la planta, así como por cambios de tipo genético(23) .

En general, el AE exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana. En las Figuras 2 y 3, se muestran los resultados obtenidos por el método de difusión en disco, usando las cinco concentraciones de AE desde el 20 hasta el 100%, extraído por la técnica AV, de hojas secas recolectadas en la Zona 2. Se observa que para *E. globulus*, cuando se usó el 80% de aceite, se encontró el mayor grado de inhibición frente a *Salmonella* con un halo de 12 mm, seguido de 9.1 mm frente a *Bacillus subtilis*, 7.9 mm frente a *Enterococcus faecalis*, 7.85 mm frente a *Escherichia coli* y 4 mm para *Staphylococcus aureus*; mientras que para la especie *E. camaldulensis*, usando la misma concentración del AE, la acción inhibitoria, en su orden de mayor a menor: *E. coli* con 10.5 mm, *E. faecalis* con 8.5 mm, *Salmonella spp* con 7.8 mm, *S. aureus* con 6.8 mm y *B. subtilis* 5.8 mm.

Los valores de CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) fueron mayores utilizando el AE de hojas secas de *E. camaldulensis* (Tabla 3), indicando que se necesitan concentraciones más altas del aceite para inhibir las cepas bacterianas, con relación al aceite extraído de *E. globulus* (Tabla 4). De esta manera, este último AE resulta más efectivo, por cuanto se requerirán menores dosis. La concentración mínima inhibitoria (CMI) determinada para el AE de *E. globulus* fue en su orden, de mayor a menor actividad: Para *S. aureus* 12.4 $\mu\text{g/mL}$, *B. subtilis* 16.5 $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* 23.4 $\mu\text{g/mL}$, *E. coli* 34.2 $\mu\text{g/mL}$ y *Salmonella spp* 51,36 $\mu\text{g/mL}$ demostrando un mayor actividad en comparación con

E. camaldulensis cuyos resultados fueron: Para *S. aureus* 33,2 $\mu\text{g/mL}$, *B. subtilis* 31.36 $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* 30 $\mu\text{g/mL}$, *E. coli* 85.6 $\mu\text{g/mL}$ y *Salmonella spp* 57.5 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores constituyen un dato importante para futuras investigaciones sobre la eliminación de la microbiota causante de contaminación en alimentos.

Al desarrollar el análisis estadístico ANOVA se aprecia las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), al realizar el análisis por bacteria, zona, método de extracción, tipo de hoja, de acuerdo a los resultados presentados. A su vez los resultados obtenidos muestran una distribución normal.

Estudios recientes muestran que es mayor el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial de eucalipto, con respecto a algunos conservantes químicos evaluados (20),(24,25) , lo que justifica su potencial aplicación en la industria alimentaria.

Conclusiones

El aceite esencial (AE) extraído por el método arrastre con vapor de agua (AV) y a partir de hoja seca (HS) de *E. globulus*, recolectado en la Zona 2, fue el que presentó el mayor rendimiento (4%), a diferencia de lo obtenido con *E. camaldulensis*, que bajo las mismas condiciones presentó un rendimiento más bajo cercano al 3%, probablemente debido al menor tamaño de la hoja.

La técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR) permitió identificar los compuestos mayoritarios presentes en el AE de *Eucalyptus globulus* encontrando como componente primordial (77 a 82%) el 1,8-Cineol o

Eucaliptol, el cual actúa en sinergia con otros principios activos antibacterianos, tales como: α -Pino, Limoneno, α -Terpino, α -Copaeno, Guaiol, β -Terpino-4-ol y α -Terpineol.

De las cinco concentraciones de AE que se analizaron (20%, 40%, 60%, 80% y 100%) en el estudio de la actividad antibacteriana, a partir del método de difusión en disco, el AE de la especie *E. globulus* en una concentración del 40%, obtenido por el método AV y con hojas secas (HS), bajo las condiciones estipuladas en este estudio, demostró poseer mayor eficiencia en cuanto a la actividad antibacteriana frente a las cinco cepas de interés: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*.

El AE foliar de la especie *E. globulus* presentó las CMI más bajas frente a las bacterias Gram positivas (Gram+), tales como: *E. faecalis*, *B. subtilis* y *S. aureus* con valores de 23.4 $\mu\text{g/mL}$, 16.5 $\mu\text{g/mL}$, 12.4 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Referencias Bibliográficas

- 1.-Gilles M., Zhao J., An M., Agboola S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chemistry **119** , 731–737
- 2.-Bakkali F., Averbeck S., Averbek D., Idaomar M. et al. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology **46**, 446–475
- 3.-Amakuraa Y., Umino Y., Tsujia S., Itob H., Hatanob T., Yoshidab T., Tonogaia Y.



(2002). Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *Food Chemistry* **77**, 47–56

4.-Nejad S., Hadian J., Mirjalili H., Sonbolia A., Yousefzadi M. et al. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry* **110**, 927–931

5.- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International J. of Food Microbiology* **94**, 223-253.

6.-Dupont S., Caffin N., Bhandari B., Dykes G. (2006), In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control* **17**, 929–932

7.-Gonzalez D. (2003). Biocomercio Sostenible. Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, Colombia. 109p

8.- Delaquis P., Stanich K., Girard B., Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 101– 109

9.-Maccioni A., Anchisi C.,Sannay A., Sarduy C.,Dessi S. (2002). Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science* **24**, 53-59

10.-Oyedegia A., Ekundayoa O., Olaworeb O., Adeniyi B., Koenig W. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia* **70**, 526-52

11.-Alitonou G., Felicien A., Valentin D., Edwige A., Dangou D. (2004). Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. *C. R. Chimie* **7**, 1051–1055

12.-Stashenko E.,Muñoz A.,Martinez J. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Et Technica*, vol XIII, 33, 165 – 166.

13.-Lucchesi M.,Chemata F.,Smadja J., Favretto L.,Colnaghi G., Visinoni F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta* **555**, 157–160

14.- Adams R. (2005). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream Illinois, USA. 469p.

15.-Ferraro M.,Sweonson J. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 35 pp

16.-Gimenez A.,Feresin GE.,Tapia A., Gutierrez Ravelo A., Zacchino S., Sortino M., Schmeda-Hirschmann G. (2003). Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **89**, 73-80.

17.- NAS, (1996). Food Protection Comittee, Food and Nutrition Board. Procedures for the testing of intentional food additives to establish their safety for use. FAO Nutrition Meetings reprot series N0 29. WHO. Technical report.

18.- Martos M., Navajas Y., Lopez J., Perez A. et al, (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. Meat Science **85**, 568–576

19.- Gutierrez J., Ryan C., Bourke P. (2008); The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology **124** , 91–97

20.- Cowan M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Department of Microbiology, Miami University, **693**. 564 – 582

21.- FAO (Food and Agriculture Organization). Forestry Department (1995). In: Flavours and fragrances of plant origin, chapter 5, *Eucalyptus* oils. http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/V5350E/V5350E00.html (2009).

22.- Bandoni A. (2000). Los recursos vegetales aromática en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de editoriales universitarias. pp. 29-43, 149-171, 197-232.

23.- Aranda R., Rodriguez Y., Garza B., Lopez L., Torres N. (2009). Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. Medicina Universitaria **11**, 156-164

24.- Ghalem B., Mohamed B., (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology **2**, 211-215



Figura 1. Mapa del municipio de Pamplona, que ubica las zonas de recolección del material vegetal

Figura 2. Efecto del AE de *E. globulus* (HS, AV, Zona 2) por el método de difusión en disco.

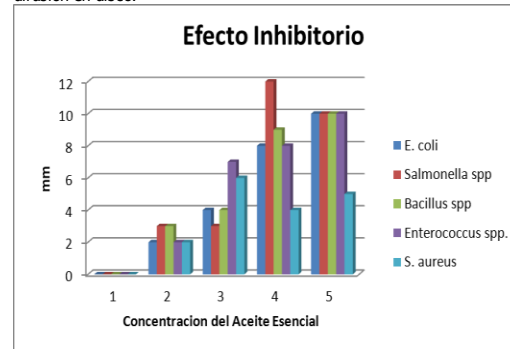


Figura 3. Efecto del AE de *E. camaldulensis* (HS, AV, Zona 2) por el método de difusión en disco.

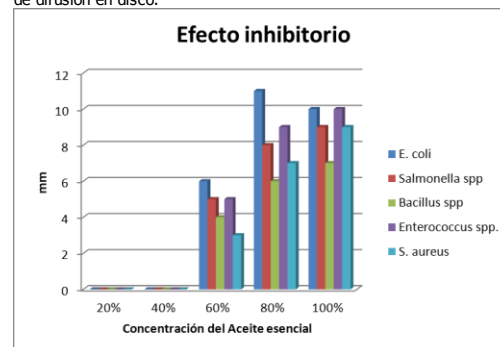


Tabla 1. Concentración Relativa (%) de los componentes mayoritarios del AE de *E. globulus*

No Pico ^a	I _K TEORICO	I _K EXPERIMENTAL	NOMBRE COMPUESTO	CONCENTRACION RELATIVA %
1	932	934	α -Pino	3,16
2	988	990	β -Mirreno	1,12
3	1002	1005	α -Felandreno	0,4
4	1014	1020	α -Terpineno	1,1
5	1024	1031	Limoneno	3,7
6	1031	1033	Eucaliptol o 1,8-Cineol	82,27
7	1096	1101	Linalol	1,3
8	1182	1180	Terpinen-4-ol	1,4
9	1188	1193	α -Terpineol	1,2
10	1376	1379	α -Copaeno	0,6
11	1490	1496	β -Selineno	0,59
12	1600	1593	Guaiol	2,76

^aNúmero de pico; I_K Índice de Kováts

Tabla 2. Concentración Relativa (%) de los principales componentes del AE de *E. camaldulensis*

No Pico ^a	I _K TEORICO	I _K EXPERIMENTAL	NOMBRE COMPUESTO	CONCENTRACION RELATIVA %
1	932	934	α -Pino	3,64
2	988	990	β -Mirreno	1,41
3	1002	1005	α -Felandreno	0,3
4	1014	1020	α -Terpineno	2,31
5	1024	1031	Limoneno	3,21
6	1031	1033	Eucaliptol o 1,8-Cineol	77,41
7	1096	1101	Linalol	0,72
8	1182	1180	Terpinen-4-ol	3,68
9	1188	1193	α -Terpineol	1,95
10	1376	1379	α -Copaeno	1,4
11	1490	1496	β -Selineno	0,5
12	1600	1593	Guaiol	0,7

^aNúmero de pico; I_K Índice de Kováts

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el AE de *E. globulus*

Microorganismo	ATCC	G ^a	CMI (μg/mL) ^b
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	34.2
<i>Salmonella enteritidis</i>	17036	-	57.5
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	16.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	+	23.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	+	12.4

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el AE de *E. camaldulensis*

Microorganismo	ATCC	G ^a	CMI (μg/mL) ^b
<i>Escherichia coli</i>	25922	-	85.6
<i>Salmonella enteritidis</i>	17036	-	51.36
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	31.36
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	+	30.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	+	33.2