



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In vitro* DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES REGIONALES PROMISORIAS SOBRE AISLAMIENTOS DE *Helicobacter pylori*

Jaqueline Mena Huertas¹, María Clara Yépez Chamorro²

Fecha de recepción: Agosto 1/07

Enviado a evaluar: Sep. 6/07

Aceptado: Nov. 09/07

RESUMEN

En nuestra región, la infección por *Helicobacter pylori* ha cobrado gran relevancia debido a su alta prevalencia, el costo del tratamiento, la dificultad de su erradicación y su asociación con el desarrollo de cáncer gástrico y, considerando que la actividad antibacteriana presentada por varias plantas medicinales ha sido utilizada tradicionalmente por varias generaciones, este estudio evaluó *in vitro* la actividad anti-*H. pylori* de extractos de plantas regionales promisorias con el fin de encontrar tratamientos complementarios alternativos para la infección. Para obtener los aceites esenciales y acuosos se utilizó el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas, y para la obtención de extractos puros se realizó una maceración directa con agua destilada estéril; la antibiosis se evaluó por el método de difusión en placa en agar columbia suplementado con sangre de cordero al 8%, utilizando sensidiscos impregnados con 1.5 µl de cada extracto. Los extractos que resultaron promisorios son en su orden de efectividad: aceite esencial y extracto acuoso de *Allium sativum*, aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y aceite esencial de *Ruta graveolens*, puesto que presentaron halos de inhibición estadísticamente significativos con promedio de 92.5 mm, 56.1mm, 10.55mm y 10.3mm respectivamente, en relación con el testigo ($P < 0,00001$). Es necesario realizar pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad e inocuidad en modelos murinos, antes de recomendar el uso de extractos como complemento en el tratamiento de erradicación de *H. pylori* de mucosa gástrica de humanos.

Palabras clave: Extractos vegetales, aceites esenciales, *Helicobacter pylori*, efecto antibacterial

1 M.Sc. en Ciencias -Biología (Universidad del Valle). Docente Tiempo completo Universidad de Nariño. Categoría Asistente. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. sajamena@udenar.edu.co

2 M.Sc en Ciencias Biomédicas (UNAM). Docente Tiempo Completo Universidad de Nariño. Categoría Asociado. Facultad de Ciencias de la Salud. Directora Centro de Estudios en Salud CESUN. Universidad de Nariño. mcyech@udenar.edu.co

ABSTRACT

In our region, the infection for *Helicobacter pylori* has gained great relevance due to its high prevalence, the cost of the treatment, the difficulty of eradicating it, and its association to the development of gastric cancer, and, considering that the anti-bacterial activity presented by various medicinal plants has been traditionally used and profited by several generations, this study evaluated in vitro the anti-*H. pylori* activity of the extract of promissory native plants with the purpose of finding complementary alternative treatments for the infection. In order to obtain the essential and aqueous oils, the hydro distillation method assisted with microwave radiation was used. To obtain the pure extracts a direct maceration with sterile distilled water was carried out. The antibiosis was evaluated using the diffusion in agar columbia plate method complemented with lamb blood at 8%, using sense discs impregnated with 1.5 µl of the extract. The extracts that resulted promissory are the following in order of effectiveness: essential oil and aqueous extract of *Allium sativum*, essential oil of *Rosmarinus officinalis* and essential oil of *Ruta graveolens*, for they presented inhibition halos averaged 92.5 mm, 56.1 mm, 10.55 mm and 10.3 respectively and that these present significant statistical differences in relation to the witness ($P < 0,00001$). However, it is necessary to carry out some citotoxicity, genotoxicity and inocuity before recommending them for human consumption.

Key words: Vegetable extracts, essential oils, *Helicobacter pylori*, anti-bacterial effect.

INTRODUCCIÓN

En Nariño la prevalencia de la infección por *Helicobacter pilory* en niños de 6 años es de 82% y generalmente se mantiene durante toda la vida. Esta bacteria es reconocida por la OMS como un agente cancerígeno, que se elimina a través de un tratamiento constituido por antibióticos y un inhibidor de protones; dicho tratamiento además de ser costoso no previene la aparición de la reinfección^(1,2). El objetivo del tratamiento es la erradicación de la bacteria, sin producir efectos secundarios y sin inducir resistencia bacteriana; sin embargo este propósito no siempre se logra, debido a la resistencia a los antibióticos y a los efectos secundarios que puede causar.⁽³⁾

La falta de adherencia al tratamiento antimicrobiano es la causa más común del fracaso de la erradicación. Los efectos adversos son frecuentes en la terapia triple antimicro-

biana (bismuto, tetraciclina y metronidazol), en comparación con otras en las que se utiliza el omeprazol; estos efectos, ampliamente conocidos, consisten habitualmente en cefaleas, náuseas, vómitos, sensación de mareo entre otros, enfatizando la encefalopatía por bismuto y los problemas en el crecimiento de los huesos y del esmalte de los dientes producidos por el uso de tetraciclinas.^(4,5)

A la búsqueda de propiedades medicinales, nutricionales, industriales, farmacológicas y biotecnológicas en la materia viva se le llama bioprospección y es una actividad tan antigua como el hombre mismo,⁽⁶⁾ es la pesquisa de compuestos de valor comercial a través de la investigación y análisis de la diversidad biológica y el conocimiento tradicional indígena. La cantidad de organismos en donde se pueden encontrar distintas moléculas con cualidades

medicinales (llamadas activos biológicos) es tan grande, como el número de especies que existen en nuestro planeta. Teniendo en cuenta sus características metabólicas esta búsqueda se realiza principalmente en plantas vasculares, microorganismos, hongos e insectos⁽⁷⁾. El tratamiento anti- *Helicobacter pylori* no se escapa de estos avances; por esta razón en diferentes lugares del mundo se han evaluado diferentes extractos de plantas, algunos de los cuales están siendo utilizados en terapias complementarias con el fin de disminuir los efectos del tratamiento convencional^(8,9,10) de igual manera, en el grupo de prevención de cáncer en la Universidad de Nariño se han realizado estudios de Bioprospección previos, obteniendo buenos resultados para el control *in vitro* de *H. pylori* con el aceite esencial de pulpa de *Carica candamarcensis* (chilacuán)⁽¹¹⁾.

En este estudio se buscó evaluar el efecto *in vitro* de extractos acuosos y aceites esenciales de plantas medicinales regionales promisorias sobre aislamientos de *H. pylori*, teniendo en cuenta que en la cultura popular se les ha reportado muchas propiedades terapéuticas. Para el estudio se utilizó el método de sensidiscos mediante difusión en placa en Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 8%; utilizando inóculos vigorosos de *H. pylori* con una densidad aproximada de 1×10^8 UFC según la escala de Mac Farland. Finalmente, se obtuvo muy buenos resultados con cuatro extractos, destacándose en su orden de extensión en relación con la formación de halo de inhibición: Aceite esencial y extracto acuoso de bulbos *Allium sativum* (ajo), aceite esencial de follaje de *Rosmarinus officinalis* (romero) y aceite esencial de follaje de *Ruta graveolens* (ruda). De igual manera se observaron diferencias significativas que sustentan que los aceites esenciales tienen mayor poder de inhibición que el de los extractos puros o acuosos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos vegetales

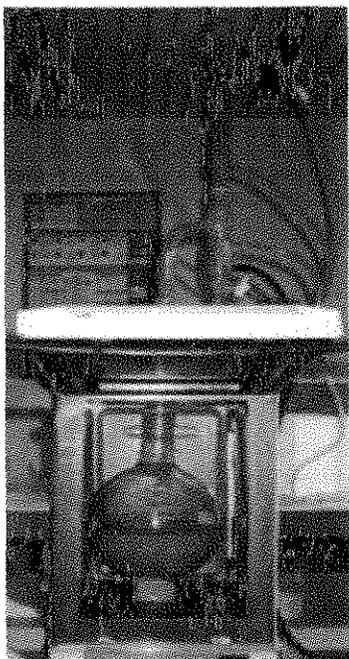
Para la recolección del material se consideraron condiciones de crecimiento de la planta (altura, m.s.n.m, temperatura y humedad relativa), época de recolección (crecimiento vegetativo, prefloración, floración, madurez) y tejidos recolectados (hojas y/o frutos). Cada material fue etiquetado adecuadamente con una ficha de registro donde se señaló lugar de procedencia, peso en fresco y fecha de recolección. Todas las muestras fueron llevadas a identificación en el herbario PSO de la Universidad de Nariño.

En el caso de la Ruda (*Ruta graveolens*), romero (*Rosmarinus officinalis*), Llantén (*Plantago major*), Paico (*Chenopodium paico*) y Hierba buena (*Menta officinalis*), se colectó la parte aérea (follaje) de plantas de diferentes cultivos y aparentemente sanas; en el caso de la Caléndula (*Calendula officinalis*) se utilizaron las flores y para el Ajo *Allium sativum* la recolección de bulbos se hizo teniendo en cuenta la apariencia del follaje y las características del bulbo. Dicho material se lavó con agua con hipoclorito al 1% para eliminar residuos y/o patógenos y se secó durante 48h con aire circulante a 50°C, se molió y se guardó en recipientes herméticos y estériles de plástico a 4°C hasta el momento de su utilización.

Para obtener los extractos de aceite esencial y acuoso de las plantas medicinales se utilizó el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHM) con la asesoría y colaboración de miembros del grupo de "Productos naturales" del Departamento de Química de la Universidad de Nariño. Para esto, las muestras inicialmente se lavaron con solución de hipoclorito al 2% para eliminar cualquier agente contaminante y luego se sometieron a secado al ambiente durante quince días, a excepción del estudio con ajo. Se tomaron 500 grs del material seco y se trituró

para luego introducirlo en un balón de 4 litros de capacidad al que se le adicionaron 200 mls de agua destilada y se lo acopló al sistema de acuerdo con el montaje de la figura 1, que se encuentra en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Universidad de Nariño.

Figura 1. Montaje de MWHD



Fuente: Mena *et al.* 2005. actividad antibacteriana *In vitro* de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. Universidad y salud. Año 5 Vol 1 No. 6 p 15.

La extracción se realizó utilizando un horno microondas LG, modelo MB- 14VG, con una potencia de salida 2450 MHz y nivel de potencia 7 (7% de la potencia máxima) durante 90 minutos. El aceite esencial extraído por su alta volatilidad se recogió sobre 5 mls de acetato de etilo de los cuales se tomaron 1.5 mls y se eliminaron trazas de agua con Na_2SO_4 anhidro. El extracto acuoso fue extraído de la fase inferior del producto obtenido. Posteriormente se determinó el pH de cada uno de los extractos obtenidos y se realizó inmediatamente la evaluación de antibiosis.

Para el caso del trabajo con bulbos de ajo se siguió el mismo procedimiento con 1000 grs de bulbos frescos triturados. Sin embargo, para las flores de *Caléndula officinalis* y el follaje de *Plantago major* no fue posible obtener aceite esencial por este método, por lo tanto se evaluó únicamente su extracto acuoso y un extracto puro producto de la maceración con agua destilada estéril ADE

Obtención del inóculo de *H. pylori*

Se obtuvo a partir de fragmentos de biopsias del antro estomacal de 15 pacientes con antecedentes de síndrome ulceroso (con previo conocimiento de la investigación y con la firma de la correspondiente autorización), mediante endoscopia superior realizada por un médico especialista, con un equipo gastroduodenoendoscopia Olympus®, en el Hospital Universitario Departamental de Nariño E.S.E. Tras la verificación de la presencia de la bacteria mediante test de urea, en el laboratorio No. 4 de Microbiología de la Universidad de Nariño se realizó el aislamiento y purificación, realizando inicialmente un macerado en mortero estéril de cada muestra en 100 μl de solución salina 0.9% y posteriormente una siembra por agotamiento en agar sangre al 8% con suplemento Dent. Las cajas se incubaron a 37 °C en cámara microaerofílica con sobres Campypack (BBL) hasta observar la formación de colonias (48 - 72 horas). Luego se realizó la verificación morfológica microscópica y microscópicamente (tinción de Gram) y las correspondientes pruebas bioquímicas de identificación (Test de urea, oxidasa (oxid) y catalasa).

Evaluación de Antibiosis

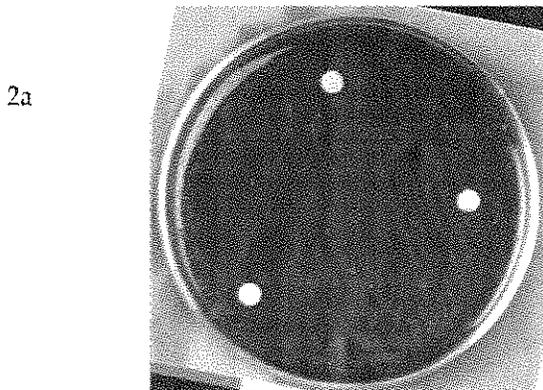
Se utilizó el método de difusión en placa en agar columbia suplementado con sangre de cordero al 8%, utilizando inóculos vigorosos de *H pylori* con

una densidad aproximada de 1×10^8 UFC según la escala de MacFarland. Encada unidad experimental (caja de petri) se utilizaron 3 sensidiscos: dos impregnados con 1.5 μ l de uno de los extractos de cada planta (Aceite esencial ó extracto acuoso) y otro correspondiente al testigo con 1.5 μ l de agua destilada estéril (ADE) cada prueba con 10 ensayos y por duplicado (fig 2a).

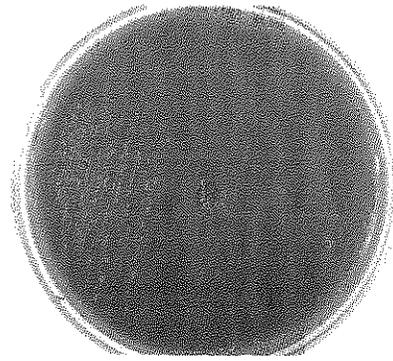
Sin embargo, para el extracto de aceite esencial de ajo fue necesario ubicar únicamente un sensidisco en cada unidad experimental y dejar los testigos en otra unidad experimental, porque el halo de inhibición fue tan grande que cubría la caja petri y no permitía una adecuada evaluación de los resultados (fig 2b). Las cajas se incubaron en las mismas condiciones señaladas para la obtención del inóculo.

Al cabo de 72 horas de incubación, se midieron los diámetros de las zonas claras alrededor de los sensidiscos (halos de inhibición) como indicadores del efecto inhibitorio de crecimiento bacteriano. Para su evaluación se aplicó un diseño irrestrictamente al azar de una sola vía y un solo factor, con un total de 260 unidades experimentales evaluadas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y posteriormente a la prueba de medias de Tukey.

Figura 2a Disposición de sensidiscos en cada unidad experimental (caja de Petri).
2b Ubicación de sensidisco de



2b



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

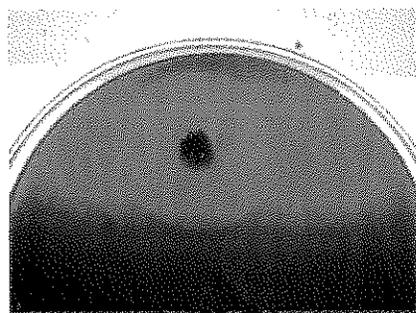
De 15 paciente evaluados, el 73.3% (11) resultaron positivos para *H. pylori*, resultados que fueron verificados con las pruebas bioquímicas, macroscópicas y microscópicas pertinentes, a partir de ellos se establecieron los inóculos vigorosos utilizados para la prueba de antibiosis.

Teniendo en cuenta el diámetro de halos observados (fig. 3A y 3B), el estudio demuestra que todos los extractos evaluados tienen algún efecto inhibitorio sobre *H. pylori*; sin embargo, el análisis de varianza indica la presencia de diferencias significativas entre tratamientos con un nivel de confianza del 95%.

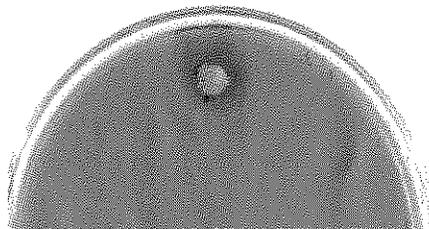
La prueba de medias de Tukey (fig 4), demuestra la presencia de diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.00001$). Se puede observar que el mejor tratamiento es el de aceite esencial de ajo *A. sativum* con halos de inhibición promedio de 92.5 mm, seguido por los halos de extracto acuoso *A. sativum* (ajo), aceite esencial de follaje de *R. officinalis* (romero) y aceite esencial de follaje de *R. graveolens* (ruda) con halos promedio de 56.1mm, 10.55mm y 10.3mm de diámetro respectivamente. El resto de tratamientos, aunque demuestran alguna actividad, ésta es poco significativa y muy similar al testigo, permitiendo descartarlos como promisorios para el tratamiento de *H. pylori*.

Figura. 3 A: La línea punteada indica el halo de inhibición observado con extracto acuoso de ajo. B: La línea punteada indica halo de inhibición observado en el tratamiento con aceite esencial de Ruda

3A



3B



Adicionalmente se realizó un análisis de varianza para comparar el tipo de extracto evaluado (Aceite esencial, Extracto puro, Extracto Acuoso) y su acción sobre *H. pylori* análisis que demostró que efectivamente existían diferencias significativas entre ellos ($P = 0.000001$). Posteriormente se realizó un análisis de medias de Tukey que presentó los resultados relacionados en la figura 5; allí se observa que el promedio de diámetros obtenidos con los aceites esenciales es significativamente mayor al obtenido, tanto con extractos acuosos como extractos puros.

Es importante mencionar que para este último análisis no se tuvo en cuenta los resultados obtenidos con los tratamientos con ajo, puesto que generaban una desviación estándar muy grande.

El ajo (*Allium sativum*), considerada una planta medicinal pues varios estudios han demostrado

ampliamente una serie de bondades terapéuticas entre las cuales se destaca su actividad antimicrobiana, posee una elevada actividad anti-*H. pylori* (12,13,14). Ohta sugiere que el efecto antibacteriano del aceite esencial de ajo es mayor en comparación con las otras fracciones polares analizadas (15); todo esto ha permitido el desarrollo de varios estudios complementarios entre los cuales se ha evaluado la toxicidad de sus componentes y su efectividad en tratamientos tanto *in vivo* (en combinación con la terapia convencional), como en diferentes formas de presentación, con resultados promisorios (16, 17,18). Estas evidencias nos permiten recomendar la inclusión de *Allium sativum* en la dieta de los Nariñense como un mecanismo adicional de prevención para la infección por *H. pylori*; además es conveniente continuar con el estudio de otras plantas del género *Allium* para verificar si es posible encontrar este mismo tipo de actividad.

Los resultados de la actividad anti-*H. pylori* observados en el extracto de aceite esencial de romero, se pueden explicar con el estudio realizado por Angioni *et al.* quien reporta que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* está formado en un 80% por α -pineno, camphor, verbenona, 1,8 cineole y bornyl acetato, compuestos con actividad biológica antimicrobiana (19). Adicionalmente, un estudio posterior realizado por Santoyo *et al.*, evaluó la actividad antimicrobiana del mismo extracto en bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos, corroboró que todos los compuestos mencionados tienen actividad microbiana, sin embargo la mayor actividad antibiótica se obtuvo con camphor y verbenona (20). Adicionalmente existen diversas investigaciones en las que se demuestra que el aceite esencial de romero presenta diferentes tipos de actividad biológica (antioxidante, antibacterial, anticancerígena, actividad fotoprotectora etc.) (21,22,23). Por todo esto se puede considerar a *R. officinalis* una planta promisoriosa para coadyuvar en el tratamiento convencional contra la infección por *H. pylori*.

Estudios farmacológicos realizados con Ruda han demostrado que en su aceite esencial existen por lo

Figura 4. Categorías según análisis de Tukey para diámetro de halo de inhibición

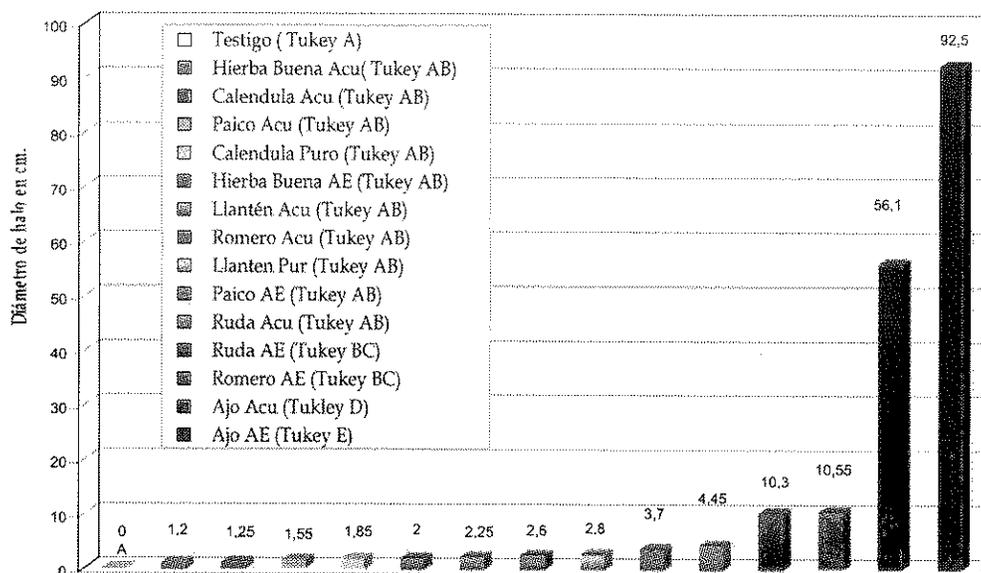
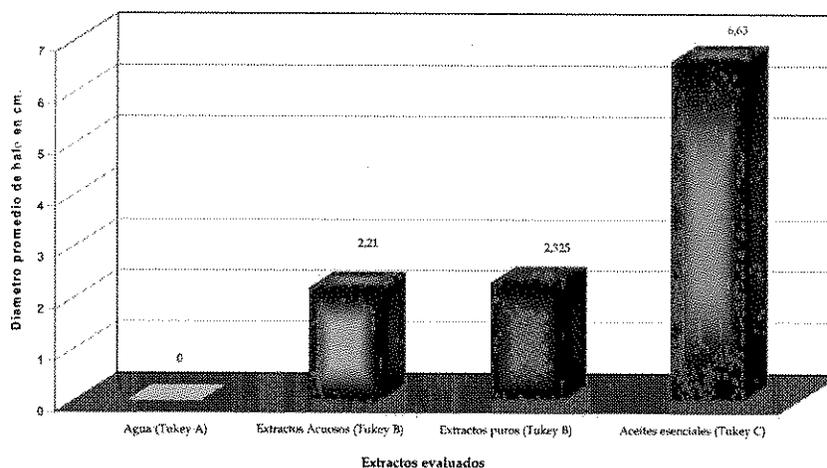


Figura 5. Análisis comparativo de halos de inhibición obtenidos con diferentes tipos de extractos (Según Prueba de Tukey)



menos 17 compuestos con actividad antimicrobial lo que evidencia su amplio efecto tanto sobre Bacterias Gram positivas como Gram negativas e incluso algunos hongos; aparentemente los alcaloides conocidos como rutacridona-epoxido e hidroxirutacridona-hepoxido son las sustancias activas presentes en los extractos de Ruda, que resultan mas efectivas para el control bacteriano actuando específicamente como

bactericidas^{24,25)}. Sin embargo, análisis realizados con el aceite esencial de *Ruta graveolens* también han reportado efectos citotóxicos, por lo cual se hace necesario hacer estudios adicionales de este compuesto antes de recomendarlo para el consumo humano⁽²⁶⁾.

En relación con la actividad observada con los extractos de aceite esencial en las diferentes

plantas, es importante mencionar que estos extractos contienen muchos metabolitos en elevada concentración y posiblemente debido a ello, se observa que su actividad biológica es mayor en comparación con los extractos acuosos o puros de las mismas plantas. Lo encontrado además, coincide con varios estudios en los cuales, independientemente del método de obtención, los aceites esenciales evidencian una mayor actividad antibacteriana, antifúngica o antioxidante en comparación con los extractos polares ^(27, 28, 29). Estos resultados, sin embargo, no descartan la evaluación de la fracción polar de extractos para futuros estudios relacionados con la temática a pesar de que se recomienda evaluar principalmente los aceites esenciales.

CONCLUSIONES

Los extractos que resultaron promisorios para ser utilizados de manera complementaria al tratamiento convencional de *H. pylori* son en su orden de efectividad: aceite esencial de *A. sativum* (ajo), extracto acuoso *A. sativum* (ajo), aceite esencial de follaje de *R. officinalis* (romero) y aceite esencial de follaje de *R. graveolens* (ruda); sin embargo, es necesario realizar pruebas adicionales de citotoxicidad, genotoxicidad e inocuidad en modelos animales y estudios piloto en humanos, antes de recomendar el uso de los extractos como complemento de los tratamientos estándar de erradicación de *H. pylori* de mucosa gástrica humana.

AGRADECIMIENTOS

Al sistema de investigaciones de la Universidad de Nariño por la financiación del proyecto, a los pacientes que colaboraron con sus biopsias, al Hospital Departamental de Nariño, al Profesor Arsenio Hidalgo Troya y a todas las personas y entidades que de una u otra forma ayudaron con el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

1. Camargo, Constanza, Yépez, M.C., Cerón, C., Guerrero N. Bravo, Correa, P. Fonthan, E. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: Comparison of two areas with contrasting risk of gastric cancer. Blackwell Publishing Ltd, *Helicobacter*, 2004 Vol. 9, No. 3: 262 - 270.
2. García, A. y Pajares, J. 2001. Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales* Vol. 21 Suplemento 2.
3. Jeng Yih Wu, Jae J. Kim, Rita Reddy, W. M. Wang, David Y. Graham and Dong H. Kwon. Tetracycline-Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates with and without Mutations in 16S rRNA-Encoding Genes. In: *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(2): 578-583.
4. Salom, A. 2006. Tratamiento sistémico de la infección por *Helicobacter pylori*. Centro Médico Docente Adaptógeno. *Medicina Sistémica*.
5. F Mégraud, H P Doermann. Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut* 1998;43(Suppl 1):S61-S65 (July).
6. Carrisoza Posada, S.; Casas Isaza, A. 2000. La Bioprospección y el Acceso a los Recursos Genéticos, una Guía Práctica. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. Primera Edición. Bogotá - Colombia.
7. RURAL ADVANCEMENT FOUNDATION INTERNATIONAL (RAFI). 1994. An Overview of Bioprospecting. Santa Cruz de la Sierra - Bolivia
8. G. E. Bergonzelli, D. Donnicola, N. Porta, and I. E. Corthésy-Theulaz 2003 Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of *Helicobacter* Infection. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 47, No. 10, p. 3240-3246
9. Nostro A, Cellini L, Di Bartolomeo S, Di Campi E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L and Alonzo V. 2005. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. In: *Phytother Res*. 19(3):198-202.
10. Fowke J., Morrow J., Motey S., Bostick, R., Ness. R. *Brassica vegetable* consumption reduces urinary F2-isoprostane levels independent of micronutrient intake. *Carcinogenesis*. 2006 ;Vol. 27. No. 10: 2096-2102.

11. Mena, J., Yépez, M., Santacruz, A., Noguera, E. 2005. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Carica candamarcensis* sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*. Revista del Centro de Estudios en Salud. Universidad de Nariño. Año5. Vol 5. No. 6, 13-21.
12. Cellini, L., E. Di Campi, M. Masulli, S. Di Bartolomeo, and N. Allocati. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13:273-277.
13. Chung, J. G., G. W. Chen, L. T. Wu, H. L. Chang, J. G. Lin, C. C. Yeh, and T. F. Wang. 1998. Effects of garlic compounds diallyl sulphide and diallyl disulphide on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. Am. J. Chin. Med. 26:353-364.
14. Sivam, G. P., J. E. Lampe, B. Ulness, S. R. Swanzy, and J. D. Potter. 1997. *Helicobacter pylori* *in vitro* susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. Nutr. Cancer 27: 118-121
15. Ohta, R. 1999. *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1811-1812.
16. Jonkers, D., E. VandenBroek, I. VanDooren, C. Thijs, E. Dorant, G. Hageman, and E. Stobberingh. 1999. Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. J. Antimicrob. Chemother. 43:837-839
17. Ross, Z. M., O'Gara, E. A., Hill, D. J., Sleightholme, H. V., Maslin, D. J. 2001. Antimicrobial Properties of Garlic Oil against Human Enteric Bacteria: Evaluation of Methodologies and Comparisons with Garlic Oil Sulfides and Garlic Powder. Appl. Environ. Microbiol. 67: 475-480
18. E. A. O'Gara, D. J. Hill, and D. J. 2000. Maslin Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, and Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori* Applied and Environmental Microbiology. May, p. 2269-2273, Vol. 66, No. 5
19. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. J Agric Food Chem. Jun 2;52(11):3530-5
20. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J Food Prot. Apr;68(4):790-5
21. Larrondo JV, Agut M, Calvo-Torras MA. 1995. Antimicrobial activity of essences from labiates. Microbios. 82(332):171-2.
22. Mangena T, Muyima NY. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Lett Appl Microbiol. Apr;28(4):291-6.
23. Lee JJ, Jin YR, Lee JH, Yu JY, Han XH, Oh KW, Hong JT, Kim TJ, Yun YP. 2007. Antiplatelet activity of carnosic acid, a phenolic diterpene from *Rosmarinus officinalis*. Planta Med. Feb; 73 (2): 121-7
24. Wolters B, Eilert U. 1981. Antimicrobial Substances in Callus Cultures of *Ruta graveolens*. Planta Med. Oct; 43(10):166-74.
25. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, Vuorela P. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin herbal plants growing in Finland. J. Ethnopharmacol. Nov;73(1-2):299-305
26. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. 2005. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. Fitoterapia. 2005 Jun; 76 (3-4):344-7.
27. Vardar-Unlü G, Candan F, Sökmen A, Daferera D, Polissiou M, Sökmen M, Dönmez E, Tepe B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). J Agric Food Chem. 2003 Jul 2;51 (14): 3958-65.
28. Tepe B, Daferera D, Sökmen M, Polissiou M, Sökmen A *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. J Agric Food Chem. 2004 Mar 10; 52(5):1132-7.
29. Sökmen A, Sökmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlü M, Akpulat HA. The *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae). Phytother Res. 2004 Jun; 18 (6):451-6.

