

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN SIRIO

CALVO M. ÁNGELES, ZIN MOHAMAD, ADELANTADO CARLES, RODRÍGUEZ MARÍA,
DE LA FUENTE AROA, SHIVA CARLOS, AROSEMENA LEONARDO
*Microbiología. Departamento de Sanidad y de Anatomía Animales.
Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona)*

RESUMEN

Se aportan los resultados obtenidos al evaluar la actividad antimicrobiana de productos naturales de origen sirio, entre los que destacan el aceite de Nigel y el Sewak.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, aceite de Nigel, Sewak, productos naturales, Siria.

INTRODUCCIÓN

El empleo de productos naturales con fines curativos es una práctica habitual en todas las culturas. Sin embargo la forma de obtención de los extractos y de aplicación directa de los productos, así como las variedades utilizadas, depende de cada zona geográfica.

Se conocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos (Gould, 1996), pero se han descrito más de 250.000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bio-activos.

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos, ya que éstos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina *buffering* (Poppenga, 2001, Smith-Schalkwijk, 1999).

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, éstas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides (Cutter, 2000; Kim *et al.*, 1995; Lis-Balchin *et al.*, 1998; Mau *et al.*, 2001, Vargas *et al.*, 1999).

Los mecanismos exactos de acción, de muchos extractos naturales, no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos, hecho que determina que pierda su control e integridad. Además de la actividad antimicrobiana de algunos extractos naturales, éstos suelen poseer otras actividades biológicas, plantas del género *Allium* son estudiadas por su efecto anticarcinogénico (Mosaad *et al.*, 2003) o, por ejemplo, sobre el sistema enzimático, mejorando el apetito y optimizando la absorción de nutrientes (Kamel, 2002).

El objetivo fundamental de este estudio es evaluar la actividad antimicrobiana de productos naturales de amplia aplicación en Siria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios experimentales se llevaron a cabo con nueve cepas bacterianas y siete cepas fúngicas procedentes de la colección de cultivos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (FVB), elegidas entre aquellas consideradas de mayor interés como causantes de procesos en el hombre o como contaminantes habituales.

Cepas bacterianas

Escherichia coli FVB467.
Salmonella enterica FVB576.
Yersinia enterocolitica FVB465.
Klebsiella pneumoniae FVB689.
Pseudomonas aeruginosa FVB15.
Bacillus subtilis FVB19.
Staphylococcus aureus FVB13.
Enterococcus faecalis FVB18.
Clostridium perfringens FVB590.

Cepas fúngicas

Aspergillus flavus FVB51.
Aspergillus niger FVB65.
Penicillium rugulosum FVB59.
Fusarium moniliforme FVB52.
Trichoderma viride FVB48.
Candida albicans FVB40.
Rhodotorula glutinis FVB89.

Productos a evaluar de origen sirio

Madera de Sewak.
Aceite de Nigél.
Aceite de ajos.
Aceite de cebolla.
Aceite de jengibre.

MÉTODOS

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de los productos en estudio se aplicó el método descrito por Bauer *et al.* (1966), y modificado por Calvo y Asensio (1999a). El medio de cultivo utilizado en los estudios frente a bacterias fue Agar Triptona Soja (TSA).

Los inóculos bacterianos utilizados fueron del orden de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Las placas de Petri de 90 mm de diámetro, contenían el medio de cultivo, que debe tener una profundidad del agar en la placa de 4 mm para evitar alteraciones en la difusión del contenido de los discos (INPPAZ, 2002).

De cada una de las cepas bacterianas se depositaban 0,1 ml del inóculo en la placa y por medio de un escobillón estéril y siguiendo tres direcciones se conseguía una buena dispersión del inóculo que se dejaba reposar durante 15 minutos.

Paralelamente se esterilizan discos de 6 mm de diámetro (Schleicher & Schuell) que se impregnaban con los productos a ensayar a las concentraciones ya determinadas. Después de eliminar el exceso de producto, se depositaban los discos de forma simétrica, con ayuda de una pinza previamente esterilizada. Asimismo se depositaba un disco estéril impregnado con agua destilada estéril como control del líquido de dilución.

Las placas se incubaron por espacio de 24 ± 2 horas a 37°C en estufa de aerobiosis y transcurrido el período de incubación indicado se procedía a la observación y medida de las zonas de inhibición de crecimiento que se expresan aplicando la fórmula:

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{Diámetro del disco (6 mm)}}{2}$$

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se realizan cultivos control de todas las cepas.

En los ensayos sobre hongos, el método fue el mismo que el indicado en el caso de las bacterias, pero teniendo en cuenta que el medio de cultivo utilizado fue Agar Sabouraud Dextrosa (SDA). En este caso los inóculos utilizados son del orden de $1-2 \times 10^6$ UFC/ml y que las placas se incubaron por espacio de 48 ± 2 horas a 28°C en estufa de aerobiosis y transcurrido el período de incubación indicado se procedía a la observación y medida de las zonas de inhibición de crecimiento que se expresan aplicando la misma fórmula que se aplica a bacterias y que se describe a continuación:

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{Diámetro del disco (6 mm)}}{2}$$

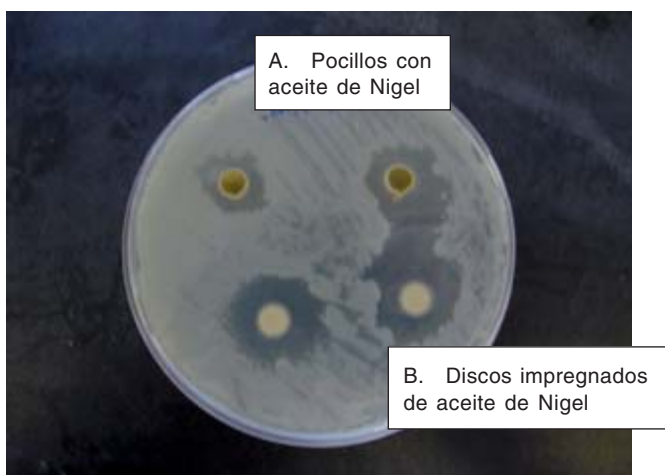
Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se realizan cultivos control de todas las cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio se resumen en las Tablas números 1 a 6.

En las Tablas números 1 a 4 se aportan los resultados al evaluar la actividad inhibidora de los aceites de nigel, ajo, cebolla y jengibre sobre las bacterias, hongos filamentosos y levaduras seleccionados en el estudio.

En la fotografía número 1 podemos observar la capacidad de inhibición del desarrollo de *Bacillus subtilis* por efecto del aceite de nigel.



Fotografía 1. Acción inhibidora del aceite de nigel enfrentado a *Bacillus subtilis*.

A. Pocillos con aceite de nigel.

B. Discos impregnados con aceite de nigel

TABLA 2. Actividad de los aceites ensayados sobre bacterias. Método de los discos

Microorganismo	Aceite de nigel	Aceite de cebolla	Aceite de ajo	Aceite de jengibre
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7 ± 0,02	NI	NI	NI
<i>Salmonella enterica</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Proteus vulgaris</i>	NI	NI	1 ± 0,03	NI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,03	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Enterococcus faecalis</i>	7 ± 0,01	NI	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 ± 0,02	0,5 ± 0,04	NI	NI
<i>Bacillus subtilis</i>	3 ± 0,03	NI	NI	NI
<i>Clostridium perfringens</i>	0,5 ± 0,02	NI	NI	NI

NI: No Inhibición.

TABLA 3. Actividad de los aceites ensayados sobre bacterias. Método de los pocillos

Microorganismo	Aceite de nigel	Aceite de cebolla	Aceite de ajo	Aceite de jengibre
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5 ± 0,03	NI	NI	NI
<i>Salmonella enterica</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Proteus vulgaris</i>	NI	NI	0,5 ± 0,03	NI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,04	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Enterococcus faecalis</i>	6 ± 0,01	NI	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,5 ± 0,03	0,5 ± 0,04	NI	NI
<i>Bacillus subtilis</i>	4 ± 0,02	NI	NI	NI
<i>Clostridium perfringens</i>	0,5 ± 0,01	NI	NI	NI

NI: No Inhibición.

TABLA 4. Actividad de los aceites ensayados sobre hongos filamentosos y levaduras. Método de los discos

Microorganismo	Aceite de nigel	Aceite de cebolla	Aceite de ajo	Aceite de jengibre
<i>Aspergillus flavus</i>	0,5 ± 0,02	NI	NI	0,5 ± 0,02
<i>Aspergillus niger</i>	2 ± 0,03	NI	NI	NI
<i>Penicillium rugulosum</i>	0,5 ± 0,02	NI	NI	NI
<i>Fusarium moniliforme</i>	3 ± 0,01	NI	0,5 ± 0,03	NI
<i>Trichoderma viride</i>	0,5 ± 0,03	NI	0,5 ± 0,02	NI
<i>Rhodotorula glutinis</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i>	NI	NI	NI	NI

NI: No Inhibición.

TABLA 5. Actividad de los aceites ensayados sobre hongos filamentosos y levaduras. Método de los pocillos

Microorganismo	Aceite de nigel	Aceite de cebolla	Aceite de ajo	Aceite de jengibre
<i>Aspergillus flavus</i>	0,5 ± 0,03	NI	NI	0,5 ± 0,02
<i>Aspergillus niger</i>	2 ± 0,03	NI	NI	NI
<i>Penicillium rugulosum</i>	0,5 ± 0,02	NI	NI	NI
<i>Fusarium moniliforme</i>	2 ± 0,01	NI	0,5 ± 0,03	NI
<i>Trichoderma viride</i>	1 ± 0,03	NI	0,5 ± 0,02	NI
<i>Rhodotorula glutinis</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Candida albicans</i>	NI	NI	NI	NI

NI: No inhibición.

En las Tablas números 6 y 7 se resumen los resultados correspondientes a la acción de fragmentos de Sewak sobre hongos y bacterias respectivamente.

TABLA 6. *Actividad de fragmentos de Sewak sobre bacterias*

<i>Microorganismo</i>	<i>Sewak</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	9 ± 0,05
<i>Aspergillus niger</i>	25 ± 0,06
<i>Penicillium rugulosum</i>	27 ± 0,05
<i>Fusarium moniliforme</i>	8 ± 0,04
<i>Trichoderma viride</i>	20 ± 0,02
<i>Rhodotorula glutinis</i>	NI
<i>Candida albicans</i>	2 ± 0,03

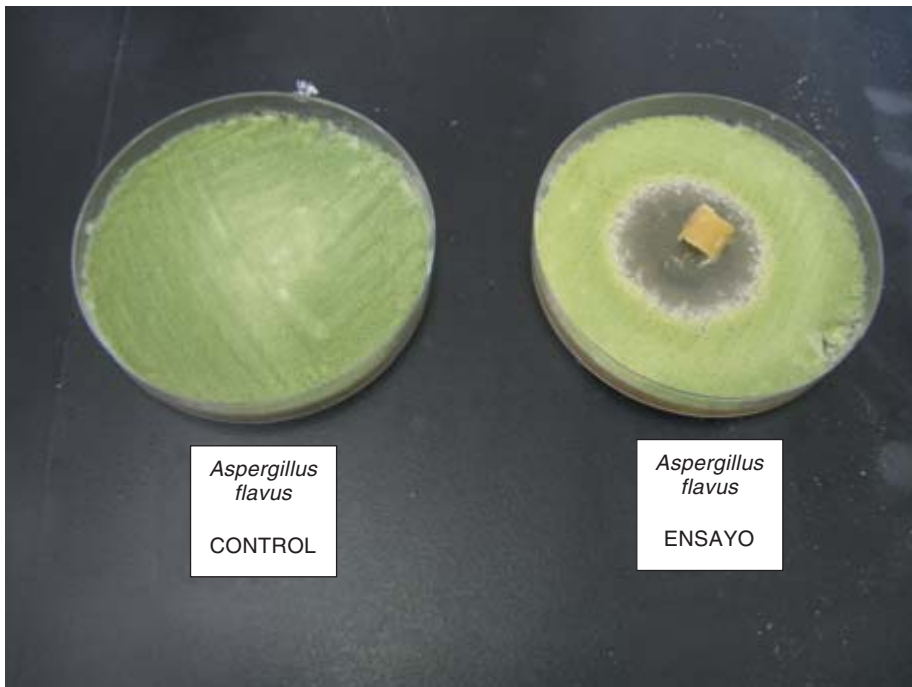
NI: No Inhibición.

TABLA 7. *Actividad de fragmentos de Sewak sobre hongos filamentosos y levaduras.*

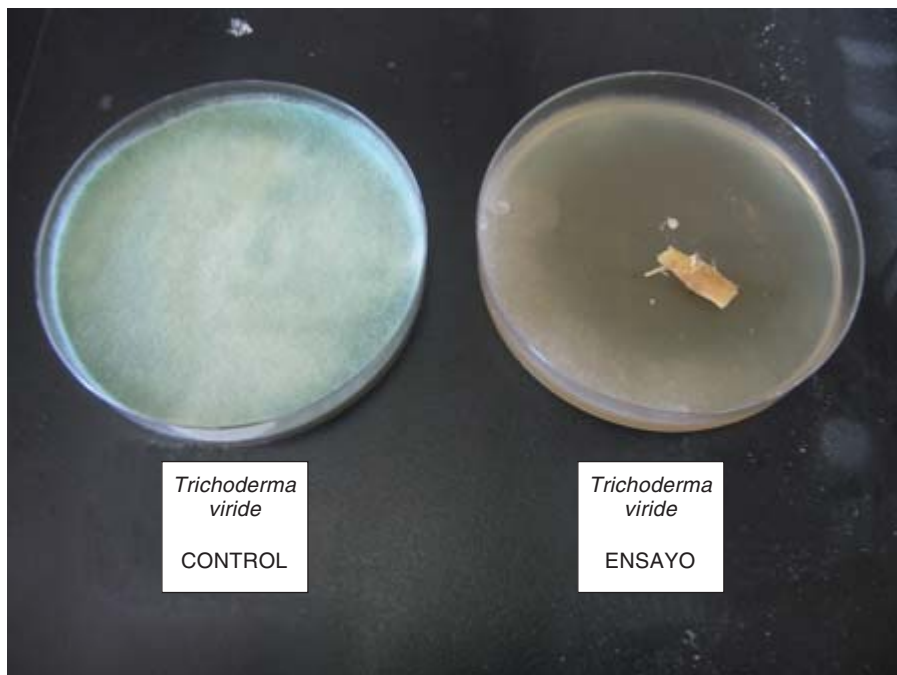
<i>Microorganismo</i>	<i>Sewak</i>
<i>Escherichia coli</i>	14
<i>Yersinia enterocolitica</i>	6
<i>Salmonella enterica</i>	NI
<i>Proteus vulgaris</i>	INHIBICIÓN COMPLETA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	INHIBICIÓN COMPLETA
<i>Bacillus subtilis</i>	INHIBICIÓN COMPLETA
<i>Clostridium perfringens</i>	INHIBICIÓN COMPLETA

NI: No Inhibición.

En las fotografías números 2 a 4 podemos observar el efecto inhibitorio del desarrollo fúngico que ejercen los fragmentos de Sewak sobre los hongos filamentosos ensayados.



Fotografía 2. Efecto de inhibición del desarrollo de *Aspergillus flavus* en presencia de un fragmento de Siwak.



Fotografía 3. Efecto de inhibición del desarrollo de *Trichoderma viride* en presencia de un fragmento de Siwak.



Fotografía 4. Efecto de inhibición del desarrollo de *Fusarium moniliforme* en presencia de un fragmento de Siwak.

Al analizar los resultados obtenidos por el método de difusión en agar podemos indicar que la solubilidad de los aceites a evaluar es un factor limitante, ya que en ocasiones como indicaron Hammer *et al.*, en el año 2003, la no presencia de halos de inhibición o la presencia de halos de pequeño diámetro pueden deberse a la insolubilidad de algunos de los compuestos.

En lo referente a los resultados de la actividad inhibitoria de los aceites ensayos podemos indicar que el aceite de nigel es el que posee mayor espectro de actividad inhibitoria, siendo entre las bacterias ensayadas, en cuanto a diversidad, más sensibles las bacterias Gram positivas que las Gram negativas. El aceite de jengibre no mostró actividad inhibitoria alguna, frente a las bacterias seleccionadas para este estudio. Si bien el valor de inhibición fue ligeramente superior en el caso de la técnica de los discos que en la de los pocillos, en todos los ensayos realizados se observó actividad inhibitoria para los mismos aceites y frente a los mismos microorganismos por las dos metodologías ensayadas. La capacidad inhibitoria superior sobre las bacterias Gram positivas que sobre las Gram negativas, observada en el estudio coincide con los datos aportados por otros investigadores quienes con aceite de canela y otros compuestos naturales señalan una mayor actividad sobre bacterias Gram positiva que sobre bacterias Gram negativas (Fisher y Phillips en 2006, Moleyar en el año 1992, y Burt en el año 2004). A pesar de todo lo indicado, la cepa bacteriana más sensible a la mayoría de los aceites ensayados ha sido *Klebsiella pneumoniae*.

Los aceites de ajo y cebolla manifiestan una baja o nula actividad inhibitoria.

Respecto a los resultados sobre la inhibición del desarrollo de los hongos podemos afirmar que el aceite de nigel, coincidiendo con la actividad sobre las bacterias,

manifiesta el mayor grado de capacidad inhibidora frente a los hongos, si bien las levaduras se muestran resistentes a la acción de todos los aceites ensayados. El aceite de cebolla y el de jengibre no manifestaron acción antifúngica alguna y en el caso de aceite de cebolla su efecto antifúngico quedó restringido a las cepas de *Fusarium moniliforme* y *Trichoderma viride*, objeto de estudio.

Las actividades inhibidoras detectadas en los aceites permiten confirmar la capacidad de los mismos y de forma selectiva de ser útiles en el tratamiento de procesos de etiología bacteriana y/o fúngica.

Cuando se ensayó la actividad de fragmentos de Sewak, se puso de manifiesto su gran actividad inhibidora frente a la mayoría de las bacterias ensayadas, ya que sólo la cepa de *Salmonella enterica* fue resistente a la acción de este producto. Nuevamente las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles, ya que incluso las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Clostridium perfringens* fueron inhibidas por completo.

En todos los casos se realizaron ensayos control para confirmar la viabilidad de las cepas, que se evidenció reiteradamente.

El ensayo de la actividad de los fragmentos de Sewak frente a hongos filamentosos y levaduras permite indicar que este producto natural es eficaz en el control del desarrollo de todos los hongos filamentosos ensayados, así como de *Candida albicans*, observándose tan sólo que la cepa de *Rhodotorula glutinis* es resistente, ya que no presentó valor de inhibición alguno frente a la acción de los fragmentos de Sewak depositados en las placas que contenían este cultivo.

Los resultados obtenidos permiten corroborar la actividad antimicrobiana que de forma empírica se atribuye a productos como el aceite de nigel y el Sewak, dos productos naturales de origen sirio y de empleo muy extendido entre la población para controlar determinados procesos de etiología bacteriana y fúngica. Asimismo debemos destacar que como ya se indica en la Introducción de este estudio, el Sewak posee una capacidad antiséptica que ha determinado que los árabes lo vengyan utilizando como pasta dentífrica e incluso como cepillo de dientes con el fin de favorecer la limpieza de los dientes y prevenir la caries.

BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. y Turck, M. (1966). «Antibiotic susceptibility by standardized single disk method». *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-96.
- Burt, S. (2004). «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review». *Int. J. Food Microbiol.* 94(3): 223-53.
- Calvo, M. A. y Asensio, J. J. (1999a). «Métodos para el análisis y control de la actividad antimicrobiana de productos útiles en alimentación animal». *Anaporc* 191: 97-02.
- Calvo, M. A. y Asensio, J. J. (1999b). «Evaluación de la eficacia de productos antimicrobianos en la alimentación animal». *Anaporc* 192: 142-46.
- Cowan, M. M. (1999). «Plants Products as Antimicrobial Agents». *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-82.

- Cutter, C. N. (2000). «Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* associated with beef». *J. Food Prot.* 63 (5): 601-07.
- Dabbah, R.; Edwards, V. M. y Moats, W. A. (1970). «Antimicrobial action of some Citrus Fruit Oils on selected Food-Borne Bacteria». *Appl. Microbiol.* 19(1): 27-31.
- Dorman, H. J. y Deans, S. G. (2000). «Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils». *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-16.
- Faleiro, M. L.; Miguel, M. G.; Ladeiro, F.; Venancio, F.; Tavares, R.; Brito, J. C.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G. y Pedro, L. G. (2003). «Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*». *Lett. Appl. Microbiol.* 36(1): 35-40.
- Fandohan, P.; Gbenou, J. D.; Gnonlonfin, B.; Hell, K.; Marasas, W. F. O. y Wingfield, M. J. (2004). «Effect of Essential Oils on the Growth of *Fusarium verticillioides* and Fumonisin Contamination in Corn». *Agric. Food Chem.* 52(22): 6824-29.
- Fisher, K. y Phillips, C. A. (2006). «The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems». *J. Appl. Microbiol.* 101(6): 1232-40.
- Friedman, M.; Henika, P. R. y Mandrell, R. E. (2002). «Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*». *J. Food Prot.* 65(10): 1545-60.
- Gangoue-Pieboji, J.; Baurin, S.; Frere, J. M.; Ngassam, P.; Ngameni, B.; Azebaze, A.; Pegnyemb, D. E.; Watchueng, J.; Goffin, C. y Galleni, M. (2007). «Screening of some medicinal plants from cameroon for beta-Lactamase inhibitory activity». *Phytother. Res.* 21(3): 284-87.
- Goldman, P. (2001). «Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology». *Ann. Intern. Med.* 135(8): 594-00.
- Gould, G. W. (1996). «Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications». *J. Food Prot.* (Supl): 82-86.
- Guo, F. C.; Kwakkel, R. P.; Soede, J.; Williams, B. A. y Verstegen, M. W. A. (2004). «Effect of a Chinese herb medicine formulation, as an alternative for antibiotics, on performance of broilers». *Br. Poult. Sci.* 45(6): 793-97.
- Gustafson, J. E.; Liew, Y. C.; Chew, S.; Markham, J.; Bell, H. C.; Wyllie, S. G. y Warmington, J. R. (1998). «Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*». *Lett. Appl. Microbiol.* 26(3): 194-98.
- Halberstein, R. A. (2005). «Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns». *Ann. Epidemiol.* 15(9): 686-99.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F. y Riley, T. V. (1999). «Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts». *J. Appl. Microbiol.* 86(6): 985-90.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F. y Riley, T. V. (2003). «Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil». *J. Appl. Microbiol.* 95(4): 853-60.
- Harvey, A. L. (1993). «Drugs from natural products: pharmaceuticals and agrochemicals». *Editorial Ellis Harwood Limit.* Inglaterra. 171 pp.
- Hitokoto, H.; Morozumi, S.; Wauke, T.; Sakai, S. y Kurata, H. (1980). «Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi». *Appl. Environ. Microbiol.* 39(4): 818-22.
- Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Watanabe, M.; Takeo, K.; Akao, M.; Nishiyama, Y. y Yamaguchi, H. (2000). «Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact». *Mycoses* 43(1-2): 17-23.
- Inouye, S.; Takizawa, T. y Yamaguchi, H. (2001). «Antibacterial activity of es-

- sential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact». *J. Antimicrob. Chemother.* 47(5): 565-73.
- INPPAZ - Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis (2000). «Taller Internacional sobre Vigilancia de *Salmonella* y de la Resistencia Antimicrobiana en Patógenos Transmitidos por los Alimentos». Buenos Aires (Argentina).
 - Kamel, C. (2002). «Re-defining botanicals». *Feed Int.* 3: 24-27.
 - Kim, J.; Marshall, M. R. y Wei, C. (1995). «Antibacterial activity of some essential oil components against five food-borne pathogens». *J. Agric. Food Chem.* 43: 2839-45.
 - Kim, S. y Fung, D. Y. (2004). «Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (Puerariae radix) tea extracts on food-borne pathogens in liquid medium». *Lett. Appl. Microbiol.* 39(4): 319-25.
 - Lis-Balchin, M.; Buchbauer, G.; Hirtenleher, T., y Resh, M. (1998). «Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system». *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 207-09.
 - Luo, M.; Jiang, L. K.; Huang, Y. X.; Xiao, M.; Li, B. y Zou, G. L. (2004). «Effects of Citral on *Aspergillus flavus* Spores by Quasi-elastic Light Scattering and Multiplex Microanalysis Techniques». *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36(4): 277-83.
 - Mau, J. L.; Chen, C. P. y Hsieh, P. C. (2001). «Antimicrobial of extracts from Chinese chive, Cinnamon and Corni fructus». *J. Agric. Food Chem.* 49: 183-88.
 - Moleyar, V. y Narasimham, P. (1992). «Antibacterial activity of essential oil components». *Int. J. Food Microbiol.* 16(4): 337-42.
 - Oussalah, M.; Caillet, S. y Lacroix, M. (2006). «Mechanism of Action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory Essential Oils against Cell Membranes and Walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*». *J. Food Prot.* 69(5): 1046-55.
 - Paranagama, P. A.; Abeysekera, K. H.; Abeywickrama, K. y Nugaliyadde, L. (2003). «Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus*. Isolated from stored rice». *Lett. Appl. Microbiol.* 37(1): 86-90.
 - Peris, S. y Asensio, J. J. (2002). «Organic acids plus botanicals». *Feed Int. March*: 17-19.
 - Poppenga, R. H. (2001). «Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary». *Clin. North Am. Equine Practic.* 17(3): 455-77.
 - Rhayour, K.; Bouchikhi, T.; Tantaoui-Elaraki, A.; Sendide, K. y Remmal, A. (2003). «The Mechanism of Bactericidal Action of Oregano and Clove Essential Oils and of Their Phenolic Major Components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*». *J. Essent. Oil Res.* 15: 356-62.
 - Smith-Palmer, A.; Stewart, J. y Fyfe, L. (1998). «Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens». *Lett. Appl. Microbiol.* 26(2): 118-22.
 - Vardar-Ünlü, G.; Candan, F.; Sökmen, A.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sökmen, M.; Dönmez, E. y Tepe, B. (2003). «Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fish. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae)». *J. Agric. Food Chem.* 51: 63-67.
 - Vargas, I.; Sanz, I.; Moya, P. y Primo-Yufera, E. (1999). «Antimicrobial and antioxidant compounds in the non-volatile fraction of expressed orange essential oils». *J. Food Prot.* 62(8): 929-32.