

COMPARACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE EXTRACTOS DE AJÍ DULCE (*Capsicum chinense*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* y *Bacillus* sp.

COMPARATIVE STUDY OF THE INHIBITING EFFECTS OF SWEET PEPPER (*Capsicum chinense*) EXTRACTS ON THE GROWTH OF *Escherichia coli* AND *Bacillus* sp.

JULIO COLIVET², GENETTE BELLOSO², ERNESTO HURTADO¹

Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Escuela de Zootecnia, ¹Departamento de Biología y Sanidad Animal, ²Programa de Tecnología de los Alimentos, Venezuela.

RESUMEN

Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, etéreos y acuosos de ají dulce (*Capsicum chinense*), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus* sp en agar nutritivo. Para obtener los extractos, los frutos de ají dulce enteros y con corte longitudinal, fueron secados en una estufa convencional a temperaturas de 70 y 100°C. Los extractos fueron obtenidos por el método de reflujo. Para la determinación de la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en agar en discos de papel de filtro. Los extractos que presentaron halos de inhibición fueron los etanólicos. Se analizó su variabilidad a través de un ANOVA. Los resultados indicaron que el de mayor poder antimicrobiano fueron los extractos obtenidos a partir de ají deshidratado entero a una temperatura de 100°C, el cual fue utilizado a concentraciones de 100% y diluido a 25%, 50% y 75%; se encontró que la concentración del 25% fue efectiva para ambos microorganismos. Los ensayos fueron realizados en los laboratorios: Nutrición y Forrajes, Tecnología de los Alimentos y Microbiología de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Oriente, Monagas, Venezuela

PALABRAS CLAVE: Ají, inhibición, antimicrobianos.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of ethanol, ether, and water extracts of sweet red pepper (*Capsicum chinense*) was evaluated on the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus* sp. streaked on nutrition agar. The extracts were obtained by drying both whole and longitudinally-sectioned sweet peppers in a conventional stove at temperatures between 70 and 100°C using the reflux extraction method. The antimicrobial activity was determined by diffusion in agar from filter paper disks, the ethanol extracts presenting halos of inhibition. An ANOVA was performed to assess their variability, the results indicating that the highest antimicrobial activity was obtained from the sweet pepper that was dehydrated whole at a temperature of 100°C and diluted at 25%, 50%, and 75%. It was found that the 25% concentration was effective for both microorganisms. The assays were performed at the Nutrition and Forage Laboratories, Food Technology and Microbiology Department of the School of Zootechnics of the Universidad de Oriente in Monagas, Venezuela.

KEY WORDS: Sweet red pepper, inhibition, antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

El interés por el uso de antimicrobianos obtenidos de plantas se ha incrementado en las últimas décadas, debido a los crecientes problemas asociados al empleo de los antibióticos y el incremento de la resistencia de las bacterias a las drogas, tales como la resistencia que presenta *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus* a la metilicilina y *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* a múltiples drogas. Lo cual a su vez incrementa los costos de producción de nuevos medicamentos efectivos a este tipo de bacterias (Cowan, 1999; Piyawan *et al.* 2005)

Conjuntamente el consumidor esta presentando problemas con la auto prescripción de antibióticos

tradicionales. Además muchas personas están interesadas en tener más autonomía sobre sus cuidados médicos. Una gran cantidad de compuestos de plantas (a menudo de pureza desconfiable) se encuentran fácilmente disponibles en mercados y tiendas naturistas, y la automedicación con estas sustancias es muy común (Klink, 1997)

Entre estos compuestos están los compuestos fenólicos, de los cuales se puede mencionar el eugenol presente en el clavo de especie que es bacteriostático frente al crecimiento de bacterias y hongos (Duke, 1985; Thomsom, 1978). Las flavonas, flavonoles y sus glucósidos se hallan naturalmente presente en las frutas y hortalizas. Uno de los flavonoles más comunes del reino vegetal es la queercertina. Schrausflatter, citado por Doyle *et al* (2001) investigó los

efectos antimicrobianos de la chalcona, flavona y flavonol. Todos estos compuestos menos el flavonol tenían efectos bacteriostáticos sobre *Staphylococcus aureus*. Las fuentes naturales de tales compuestos (manzanas, uvas, fresas, ciruelas, sorgo y cebada entre otros) también tenían ligera actividad bacteriostática frente a los microorganismos.

Además Cowan (1999) señaló que los terpenoides y aceites esenciales, son efectivos frente a bacterias, hongos virus y protozoos. También científicos en alimentos han encontrado que los terpenoides presentes en aceites esenciales de plantas han sido efectivos para el control de *Listeria monocytogenes* (Aureli *et al.* 1992). Incluso el aceite esencial de albahaca se encontró que era tan efectivo como el cloro a 125 ppm en la desinfección de brotes de hojas de lechuga (Wan *et al.* 1998)

Igualmente los alcaloides tienen efectos microbicidas (incluyendo especies de *Giardia* y *amibas*) (Cowan *et al.* 1999). Las lecitinas y polipéptidos, de los cuales se puede mencionar a la fabatina presente en las semillas de haba, que es bactericida frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *Enterococcus hirae* (Zhang y Lewis, 1997). Los alicinoides provenientes de los vapores de ajo y cebollas, que fueron efectivos frente a *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* y a las micobacterias en medios microbiológicos Caballito y Bailey citado por (Sharma *et al.*, 1981)

El ají es un fruto que tiene importancia como condimento en la preparación de alimentos en casi todas las culturas a nivel mundial, porque posee buenas cualidades nutricionales y organolépticas, difíciles de encontrar en cualquier otra hortaliza. En Venezuela, es un ingrediente irremplazable en casi todos los platos típicos de la región, es ampliamente utilizado en la elaboración de sopas de pescado, guisos, salsas picantes y empanadas. Además se le han atribuido propiedades conservantes en alimentos (principalmente a las especies más picantes); sin embargo, en experiencias cotidianas se ha demostrado que las especies dulces, como el ají dulce venezolano, tienen propiedades que alargan la vida útil de los alimentos.

El ají dulce es originario de Venezuela y el noreste de América del sur. Está relacionado con el chile habanero (*Capsicum chinense*) y el Scotch bonnet procedente de Jamaica. Varía de verde brillante a amarillo, naranja y rojo. Cuando está desarrollado, es similar al pimentón (*Capsicum annuum*), pero de tamaño más pequeño. Mide aproximadamente de 2-3 pulgadas de diámetro. La pulpa es fina, de olor muy fuerte y sabor caliente (CPI, 2003).

Presenta una serie de componentes activos siendo uno

de estos la capsicina o capsaicina, la cual es responsable del picante. Según Rodríguez (2003), la capsicina es muy poderosa; cerca de 100 veces más potente que la piperina (sustancia responsable del picante en la pimienta). No tiene ni olor ni sabor, solo estimula la liberación de neurotransmisores que estimulan los puntos receptores de dolor en la lengua y en la boca.

Otro componente es el ácido clorogénico, el cual es derivado del ácido hidroxycinnámico, que es responsable de otorgarle una sensación de dulzor a las frutas y hortalizas de color verde; de allí que este se encuentre presente en el ají verde. Es soluble en cloroformo, benceno, acetona y etanol (Berdeja, 2002).

Las coumarinas también forman parte en la composición del ají. Éstas constituyen un grupo importante de compuestos naturales. Se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxycinnámico, usualmente llamada coumarina. La mayoría de las coumarinas se encuentran libres en las plantas. Las coumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de leguminosas desde raíces hasta flores y frutos (Domínguez, 1975).

Finalmente los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$. Presentan actividad biológica contra las alergias, inflamaciones, radicales libres, hepatotoxinas, agregación plaquetaria, microorganismos, úlcera, virus y tumores. Además, puede inhibir toxinas específicas, por ejemplo, bloquean la enzima convertidora que aumenta la presión arterial (Molinos, 2003).

Un hecho importante es el señalado por Rodríguez (2003) quien demostró que el chile picante y el dulce adicionados a la carne, prolongaba de forma significativa la vida útil de la misma, limitando la oxidación, y por tanto aumentando su conservabilidad. Igualmente observó que el chile picante previene mucho más la oxidación de la grasa, la cual fue asociada a las sustancias responsables del sabor picante, es decir a la capsicina. En este estudio se consiguió prolongar la vida comercial de la carne de 4 a 16 días, lo que implica incrementarla en un 400%.

Otro aspecto de interés es el conocimiento de la medición de la actividad antimicrobiana de extractos que se mide determinando la cantidad más pequeña del agente que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo control, valor que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC) (Madigan, 2000). Existen varios métodos para determinar la actividad de un agente antimicrobiano; entre los cuales el más empleado

es el de difusión en agar; que también es conocido como el método de Kirby-Bauer. Este consiste en inocular uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar. Seguidamente se colocan sobre la superficie del agar solidificado, discos de papel de filtro con concentraciones conocidas de agente antimicrobiano. Durante la incubación los agentes antimicrobianos difunden por el agar a partir de los discos. Cuanto más lejos del disco difunde más baja es su concentración. Si el antimicrobiano es eficaz se forma un halo de inhibición que rodea al disco y puede medirse el diámetro de ese halo (Tortora, 1993).

Normalmente para medir la actividad de un agente antibacteriano se utiliza distintos tipos de bacterias que pueden variar en sus características estructurales y morfológicas; generalmente se emplea alguna cepa de interés del investigador o se utiliza una batería compuesta por cepas Gram-positivas y Gram-negativas. En muchos estudios para medir la actividad antimicrobiana de extractos vegetales se emplean bacterias tales como *Bacillus* sp y *Escherichia coli*, debido a que estas son de gran interés a nivel alimentario porque son géneros fáciles de manipular, presentan características distintas y están implicadas en la mayoría de los casos de toxiinfecciones alimentarias.

El presente trabajo tiene como objetivo comprobar el posible efecto antimicrobiano del ají dulce y así aclarar o sustentar científicamente el conocimiento popular de que el ají presenta efectos antimicrobianos en donde participa como ingrediente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y manejo de la materia prima

En esta investigación se utilizaron ajíes dulces (*Capsicum chinense*), que fueron seleccionados con la finalidad de escoger aquellos que no presentaban decoloración, daños por picaduras de insectos, mal olor ni degradación del tejido por factores mecánicos. Luego de lavados con agua; fueron secados de acuerdo a los siguientes tratamientos: ajíes enteros secados a 100°C (T_1); ajíes enteros secados a 70°C (T_2); ajíes con corte longitudinal secados a 100°C (T_3) y ajíes con corte longitudinal secados a 70°C (T_4); los cuales fueron molidos, respectivamente.

Obtención de los extractos

Se realizaron extracciones empleando distintos

solventes: agua, éter etílico, éter de petróleo y etanol. Las metodologías empleadas fueron las siguientes:

- La acuosa se realizó empleando el extractor tipo Golfisch.
- La extracción etanólica se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Faz *et al.* 2002.
- La etéreas fueron realizadas de igual forma que el procedimiento aplicado a la extracción etanólica pero variando la temperatura de reflujo; se utilizó una temperatura de 40°C para la extracción con éter etílico y 60°C para la extracción con éter de petróleo.

Determinación del efecto inhibitorio

Se sembraron en una placa de petri con el medio agar nutritivo los microorganismos a evaluar (*Escherichia coli* y *Bacillus* sp.) de manera masiva. Posteriormente, se colocaron discos de papel de filtro estériles impregnados con dos gotas del extracto y otro con el solvente empleado en la extracción (control). Se incubaron a 37°C por 24 horas y se procedió a medir el halo de inhibición con un vernier. El extracto que presentó mayor inhibición fue utilizado en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 % con la finalidad de medir la mínima concentración en donde se presentó efecto inhibitorio.

Diseño Experimental

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante un análisis de varianza, correspondiente a un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones por tratamiento y 3 repeticiones por extracto, para estudiar la variabilidad del halo de inhibición; los únicos extractos analizados bajo este modelo fueron los etanólicos debido a que los restantes no presentaron efecto inhibitorio. Se realizó una prueba de medias de rango múltiple de Duncan para detectar diferencias entre tratamientos (SAS, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad inhibitoria de los extractos

En la Tabla 1 se observa que el único extracto que presentó inhibición del crecimiento microbiano fue el etanólico. Esto posiblemente se deba a que la mayoría de los componentes activos presentes en ají (*Capsicum* sp.) son solubles en etanol, tal como lo reporta la literatura. Algunos de estos son: ácido clorogénico, que es soluble

principalmente en alcohol etílico e insoluble en los demás solventes empleados (Berdeja, 2002). Las coumarinas, que son solubles en soluciones acuosas de hidróxido de sodio y también lo son en etanol y metanol (Domínguez, 1975).

Tabla 1. Actividad inhibitoria de los extractos de ají dulce verde (*Capsicum chinense*).

Extracto	Actividad
Acuoso	-
Etanólico	+
Éter de petróleo	-
Éter etílico	-

El alcohol etílico es el solvente que puede extraer estos tipo de compuestos, ya que el agua solo es capaz de extraer sustancias con las cuales pueda hacer puentes de hidrógeno y los éteres solo extraen sustancias apolares. En cambio el alcohol puede extraer sustancias parcialmente hidrófobas que puedan tener actividad bactericida (Bernard *et al.*, 1996).

Efecto inhibitorio del los extractos etanólicos sobre *Escherichia coli*

Los extractos con ají dulce verde secados a 100°C tuvieron un efecto inhibitor mayor para *Escherichia coli* que los obtenidos con ají secado a 70°C (Tabla 2), resultados similares fueron reportados por (Muñoz 1987). Sin embargo, plantea que las temperaturas de 60 a 70°C son favorables a las degradaciones enzimáticas y que para la conservación de los principios activos es preferible secar a una temperatura entre 25 a 30°C, con una fuerte ventilación, o elevarla de 100 a 120°C. En este último caso los fenómenos enzimáticos se detienen; a esto se llama estabilización.

Tabla 2. Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de ají dulce verde (*Capsicum chinense*) sobre *Escherichia coli*.

Variable	Halos de inhibición (mm)			
	Tratamientos	n	$\bar{X} \pm DE$	Control
T ₁	60	16,35 ± 2,78	0	a
T ₃	60	12,18 ± 2,04	0	b
T ₄	60	11,80 ± 2,31	0	b, c
T ₂	60	11,08 ± 1,11	0	c

a,b,c. Valores promedios con letras similares no fueron significativamente diferentes.

T₁: ají secado entero a 100°C;

T₂: ají secado entero a 70°C;

T₃: ají secado con corte longitudinal a 100°C;

T₄: ají secado con corte longitudinal a 70°C

El comportamiento no significativo ($P > 0,05$) entre los halos de inhibición producidos por los extractos obtenidos con el ají cortado y secado a 100°C y los del ají cortado y secado a 70°C, puede ser debido a la transferencia de calor, la cual es similar porque ambos ajíes están cortados longitudinalmente; mientras que el ají secado entero a 70°C no presentó diferencia significativa con el otro tratamiento secado a la misma temperatura, lo que evidencia que el secado a una temperatura baja tiene un efecto negativo en la actividad antimicrobiana de los extractos.

Efecto inhibitorio del los extractos etanólicos sobre *Bacillus sp*

En la Tabla 3 se muestra que los extractos del ají secado entero fueron los que presentaron mayor poder inhibitorio del crecimiento de *Bacillus sp*, esto puede tener su origen la pérdida de compuestos volátiles que inhibien el crecimiento de *Bacillus sp*. Además también se muestra que el extracto obtenido con ají secado entero a 100°C fue más inhibitorio (16,82 mm) que el obtenido con el ají secado entero a 70°C (12,25 mm), lo que permite inferir que a 70°C los compuestos que podrían inhibir la actividad de los microorganismos se ven disminuido en su acción.

Tabla 3. Efecto inhibitorio del los extractos etanólicos de ají dulce verde (*Capsicum chinense*) sobre *Bacillus sp*.

Variable	Halos de inhibición (mm)			
	Tratamientos	n	$\bar{X} \pm DE$	Control
T ₁	60	16,82 ± 2,57	0	a
T ₂	60	12,25 ± 1,39	0	b
T ₄	60	11,22 ± 1,42	0	c
T ₃	60	10,68 ± 1,65	0	c

a,b,c. Valores promedios con letras similares no fueron significativamente diferentes.

T₁: ají secado entero a 100°C;

T₂: ají secado entero a 70°C;

T₃: ají secado con corte longitudinal a 100°C;

T₄: ají secado con corte longitudinal a 70°C

El efecto no significativo ($P > 0,05$) entre los extractos obtenidos con ají secados a 100 y 70°C con corte longitudinal, podría deberse, a que es una técnica de secado en donde se pierde compuestos por el hecho de cortar el ají, además hay una superficie de contacto más expuesta, lo cual puede facilitar la pérdida de compuestos inhibitorios para *Bacillus sp*; todo lo contrario ocurre con el ají secado entero, en donde el exocarpio protege el fruto del efecto secado

permitiendo sólo la pérdida de compuestos de bajo peso molecular tales como, los aceites esenciales (Sosa, 1998).

Comparación del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos sobre *Bacillus sp* y *Escherichia coli*

En la Tabla 4 se muestra que no hubo diferencia significativa del efecto inhibitorio de los extractos entre los grupos microbianos estudiados, podría ser debido a que el extracto no actúa a nivel de la pared celular; estas bacterias son diferentes en cuanto a la composición

y estructura de la pared celular; las bacterias Gram positivas (*Bacillus sp*) poseen una pared gruesa compuesta principalmente de peptidoglucano, mientras que las Gram negativas (*Escherichia coli*) tienen una pared celular más compleja, poseen en el exterior una delgada membrana de lipopolisacárido seguida por una red de peptidoglucano más delgada que en las Gram positivas y además cuenta con un espacio periplasmático antes de la membrana celular (Tortora, 1993). De este modo se puede inferir que los extractos posiblemente actúen sobre la membrana celular o el citoplasma penetrando la pared celular sin que se presente lisis de ésta.

Tabla 4. Comparación del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de ají dulce verde (*Capsicum chinense*) entre *Bacillus sp* y *Escherichia coli*.

Variable	Halos de inhibición (mm)		Nivel de confianza (95%)		
	Tratamientos	<i>Bacillus sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	Probabilidad	Significancia
T ₁		16,82	16,35	0,3419>0,05	N.S
T ₂		12,25	11,08	0,1361>0,05	N.S
T ₃		10,68	12,18	0,5640>0,05	N.S
T ₄		11,22	11,80	0,2393>0,05	N.S

N.S: no significativo

T₁: ají secado entero a 100°C;

T₂: ají secado entero a 70°C;

T₃: ají secado con corte longitudinal a 100°C;

T₄: ají secado con corte longitudinal a 70°C

Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de ají dulce (*Capsicum chinense*) (ají secado entero a 100°C) sobre *Bacillus sp* y *Escherichia coli*.

La concentración mínima inhibitoria para ambos microorganismos fue de 25% de extracto, en donde también se puede notar que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre 25 y 50% de extracto (Tabla 5), lo cual puede ser justificado porque a una

concentración de 50% el extracto presenta características bactericidas y a 25% características bacteriostáticas, pero al momento de reportar estos efectos en el crecimiento microbiano en las placas de Petri, solo se observaron halos de inhibición. También se observó que las concentraciones de 75 y 100% de extracto fueron las que presentaron mayor efecto inhibitorio. Sin embargo, entre ambas concentraciones no se encontraron diferencias significativas entre ellas.

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de ají dulce (*Capsicum chinense*) (T1) sobre *Bacillus sp* y *Escherichia coli*.

Concentraciones de extracto	Halo de inhibición (mm)		Significancia	
	<i>Bacillus sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
0	0	0	d	d
25	11	10,20	c	c
50	12,25	11,60	c, b	c, b
75	14,80	13,60	b, a	b, a
100	16,817	16,35	a	a

a, b, c. Valores promedios con letras similares no fueron significativamente diferentes.

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de ají dulce verde fueron los únicos que presentaron actividad antibacteriana sobre *Escherichia coli* y *Bacillus* sp, reflejando que los componentes activos del ají son principalmente solubles en etanol. El corte y la temperatura de secado tuvieron efecto significativo sobre la actividad antimicrobiana de los extractos.

El extracto de ají secado a 100°C produjo mayores halos de inhibición sobre *Escherichia coli* que los obtenidos con ají secado a 70°C. Para *Bacillus* sp se obtuvieron halos de inhibición superiores cuando el ají era secado entero e inferiores cuando el ají era secado con corte longitudinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AURELI, P. COSTANTINI, A.; ZOLEA, S. 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55:344–348.
- BERDEJA, A. 2002. Chlorogenic Acid. [Documento en línea]. Disponible: http://www.greatvistachemicals.com/herb_extracts/chlorogenic_acid.html. Consultado: 10/06/04
- BERNARD, D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H. 1996. Tratado de Microbiología. Masson. Barcelona, España. 456p.
- COWAN, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiological rev. 12(4):564-582.
- CPI. Chile Pepper Institute. 2003 [Documento en línea]. Disponible en: www.chilepepperinstitute.org/chile. Consultado: 20/04/04.
- DOYLE, M; BEUCHAT, L.; MONTVILLE, T. 2001. Microbiología de los Alimentos Fundamentos y Fronteras. Acribia. Zaragoza, España. 543
- DOMÍNGUEZ, X. 1975. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México, México. 270 p.
- DUKE, J. 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- FAZ, C.; HERNANDEZ, J.; MARTINEZ, B.; TORRES, R. 2002. Libro Experimental de Fitoquímica. Instituto Politécnico Nacional. México, México. 65 p.
- KLINK, B. 1997. Alternative medicines: is natural really better? Drug Top.141:99–100.
- MADIGAN, M. 2000. Biología de los microorganismos. Prentice hall. Madrid, España. 1064 p.
- MOLINOS, A. 2003. Fitoquímicos: nutrientes del futuro. [Documento en línea]. Disponible en: www.molinos.com.ar/nutrición. Consultado: 20/06/04.
- MUÑOZ, A. 1987. Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio Cultivo y Procesado. Mundi Prensa. Madrid, España. 365p
- PIYAWAN, S; SRIRIRAK, T; LIMSUWAN, S; SUPAWITA, T.; HONDA, T. 2005. Inhibitory Effects of Active from *Punica granatun* Pericarp on Verocytotoxin by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Health Sci. 51(5):590-596
- RODRÍGUEZ, J. 2003. Sabory Seguridad en los Conservantes Naturales. [Documento en línea]. Disponible en: www.consumaseguridad.com. Consultado en: 22/06/04.
- S.A.S. 1998. S.A.S, User Guider Statitics. S.A.S. Inst. INc, Cory, N.C, USA
- SHARMA, A; PADWAL, S; TEWARY, G.; BANYOPADHYAY, C. 1981. Factors Affecting Antifungal Activity of Onion Extracts Against Aflatoxin-Producing Fungi. J. Food Sci. 46: 741-744.
- SOSA, R. 1998. El poder Medicinal de las Plantas. Asociación Publicadora Interamericana. Miami, USA. 207 p.
- THOMSON, W. 1978. Medicines From the Earth. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom. 375p.
- TORTORA, G. 1993. Introducción a la Microbiología. Acribia, Zaragoza, España. 792 p
- WAN, J., WILCOCK, A; COVENTRY, M. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. J. Appl. Microbiol. 84:152–158.
- ZHANG, Y.; LEWIS K. 1997. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. FEMS Microbiol. Lett. 149:59–64.