

Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L.

Comparison of two equipments (teams) of extraction for reflux in the antimicrobial activity of the extracts watery, ethanolic and chloroform of *Piper nigrum* L.

María CABELLO NAVAS ¹ y Genette BELLOSO MORALES²

¹Departamento de Ciencias, Unidad de Estudios Básicos, Núcleo Monagas, Universidad de Oriente (UDO), Maturín 6201, estado Monagas, Venezuela y ²Escuela de Zootecnia, Programa de Tecnología de los Alimentos, Núcleo Monagas, UDO. E mails: mcabello20@gmail.com, mc13@latinmail.com y g_belloso@yahoo.com

 Autor para correspondencia

Recibido: 02/10/2008 Fin de primer arbitraje: 12/02/2009 Primera revisión recibida: 05/08/2009
Fin de segundo arbitraje: 29/08/2009 Segunda revisión recibida: 07/10/2009 Aceptado: 09/10/2009

RESUMEN

La industria alimentaria ha empleado a los vegetales (algunas de sus partes como hojas, tallos, frutos, semillas, como sus infusiones o extractos) no solo para dar sabor o color a sus productos, sino también como inhibidores del crecimiento de microorganismos no deseados en alimentos. La pimienta negra (*Piper nigrum* L.) es una de las tantas especias que se encuentra presente en los procesos de elaboración de productos manufacturados, sin embargo, son pocos los estudios sobre el efecto antibacteriano de esta planta, es por ello que en el presente trabajo se determinó el efecto inhibitorio de extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de semillas de *Piper nigrum* L. obtenidos por el método de reflujo, contra el crecimiento de bacterias Gram positivas. Los extractos se obtuvieron empleando tres solventes (agua, etanol y cloroformo) utilizando dos equipos (Goldfish y Soxhlet) para el proceso de extracción por reflujo. La actividad antibacteriana fue evaluada por el método difusión en placa de agar (Kirby-Bauer). Se evaluaron cinco tratamientos, dos equipos de extracción y tres solventes. El mayor halo de inhibición lo presentó el extracto etanólico obtenido en el equipo Goldfish sobre el crecimiento de *Bacillus cereus* (18mm), seguido por el mismo extracto pero empleando el equipo Soxhlet sobre *Streptococcus* spp. (13mm). El extracto acuoso no tuvo efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las bacterias estudiadas. El equipo Goldfish fue más eficiente para la extracción empleando etanol y el Soxhlet para la extracción con cloroformo. El extracto etanólico obtenido en ambos equipos produjo mayor efecto inhibitorio sobre: *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*). Se aplicó el análisis estadístico de Kruskal-Wallis y Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Palabras clave: *Piper nigrum*, inhibición antibacteriana, Goldfish, Soxhlet.

ABSTRACT

The food industry has used to the vegetables (some of your parts as leaves, stems, fruits, seeds, as your extracts not only to give flavor or color to your products, but also like inhibiting of the growth of microorganisms not wished in food. The black pepper (*Piper nigrum* L.) is one of so many spices that one finds present in the processes of production of manufactured products, nevertheless, are small the studies on the antibacterial effect of this plant, it is for it that in this study I determine the inhibitory watery effect of extracts, ethanolic and chloroform of seeds of *Piper nigrum* L. obtained by the method of reflux, on the growth of bacteria positive Gram. The extracts of the seeds of seeds of *Piper nigrum* L. were obtained using three solvents (water, ethanol and chloroform) using two equipments (Goldfish and Soxhlet) for the process of extraction for reflux. The antibacterial activity was evaluated by the method proposed by Kirby-Bauer (diffusion in plate of agar). There were evaluated five treatments (two equipments x three solvents). There was applied an analysis of Kruskal-Wallis and Tukey's Test ($P < 0, 05$). The major halo of inhibition it presented the extract ethanolic obtained in the equipment Goldfish on the growth of *Bacillus cereus* (18mm), followed by the same extract but using the equipment Soxhlet on *Streptococcus* spp. (13mm). The watery extract did not have antimicrobial effect on the growth of the studied bacteria. The equipment Goldfish was more efficient for the extraction using ethanol and the Soxhlet for the extraction with chloroform. The extract ethanolic obtained in both equipments produced major inhibitory effect on: *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp. and *Bacillus cereus*.

Key words: *Piper nigrum*, Microbial inhibition, Goldfish, Soxhlet.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales, constituyen alimentos naturales que siempre deben estar presentes en las comidas, debido a que proporcionan las vitaminas y minerales necesarios para el desarrollo saludable de los seres vivos. Sin embargo, el descubrimiento de que determinados alimentos presentan compuestos biológicamente activos y beneficiosos para la salud, más allá de la alimentación básica, abrió una nueva etapa en la ciencia de la nutrición. Estas sustancias adicionales, llamados fitoquímicos se encuentran, de manera natural, en semillas, frutos, hojas, raíces y tallos, por lo que se estudia su potencial para promover la salud (Bonafine *et al.*, 2006).

Las plantas no solo se consumen como alimento por los humanos, sino que en muchas ocasiones se emplean para añadirle sabor, olor o inhibir la proliferación de microorganismos en los mismos. Con estos fines se han empleado la planta completa o algunas de sus partes como la raíz, hojas, tallos, flores, semillas, frutos o extractos obtenidos de ellas. La actividad antimicrobiana es uno de los efectos intrínsecos evidentes de dichos extractos contra patógenos de origen alimentario. Su efecto depende en gran manera de su fuente de origen, método de extracción y el nivel de sustancias que contiene, de forma individual deben ser utilizados en una alta concentración para observar efectos comparables con antibióticos (Kamel, 2000).

Bruneton (2001) señala que la pimienta (*Piper nigrum* L.), es una de las especias más consumidas en el mundo, se produce en zonas tropicales o subtropicales. Los frutos del pimentero, no se pueden incluir entre los tóxicos, pero no son raros los incidentes como proyecciones oculares e irritaciones en la boca de los niños. Puede en gran y menor medida producir edema en las mucosas inducido por la piperina, principal “principio picante” de la pimienta, provocando asfixia.

Sharma *et al.*, (1984) analizaron el efecto inhibitorio de extracto clorofórmico de clavo especie, canela, pimienta, cardamomo y nuez moscada sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus*, encontraron que los extractos de clavo y canela, mostraron zonas pronunciadas de inhibición sobre el hongo, mientras que las sustancias causantes de este efecto inhibitorio, parecieran estar ausentes en la pimienta negra, cardamomo y nuez moscada al no observarse efecto inhibitorio cuando eran empleados sus extractos.

Martínez *et al.*, (2006) evaluaron el efecto inhibitorio y antioxidante de muestras de polvos de ají chirel (*Capsicum annum*) y pimienta (*Piper nigrum* L.), añadidos a chorizos frescos, almacenados en atmósferas modificadas, encontraron que la adición de polvos de pimentón rojo dulce y ají picante, así como los polvos de pimienta negra y blanca, inducen la extensión de la vida útil del embutido, dependiendo de la especia y la concentración usada. Además observaron que la pimienta negra fue la más apropiada para prolongar el tiempo de almacenamiento del chorizo, por ser más efectiva en la decoloración y la formación de olor en los chorizos.

Cunico *et al.*, (2004) realizaron un estudio de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las raíces y partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) sobre bacterias relacionadas con infecciones gastrointestinales: *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando los métodos de difusión en agar. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto etanólico de *O. martiana* presentó un alto potencial antibacteriano contra *E. faecium*, observándose la presencia de zonas de inhibición, comprobadas por la prueba de difusión en agar, mientras que no se observó acción antimicrobiana sobre el resto de las bacterias estudiadas. Cunico *et al.*, (2004) proponen que el efecto inhibitorio de extractos etanólicos de *O. martiana* sobre bacterias Gram positivas como *E. faecium* debe ser estudiado más detalladamente con la finalidad de descubrir nuevos agentes antimicrobianos naturales, como una alternativa en tratamientos en procesos infecciosos.

Garcés *et al.*, (2005) realizaron un trabajo bibliográfico sobre el rendimiento productivo animal, tras la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento. Analizaron las posibles causantes del aumento de algunas zoonosis, así como los agentes causantes de pérdida en los rendimientos productivos de los pollos de carne. Emplearon extractos vegetales como estimulantes digestivos, antisépticos, fungicidas y bactericidas. En sus estudios reportan que los extractos de orégano (*Origanum vulgare* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), romero (*Rosmarinus officinalis*), pimienta (*Piper nigrum* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.) y milenrama (*Achillea millefolium* L.), mostraron efecto antimicrobiano sobre *Salmonella* ssp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*. Además relacionaron la presencia de estos extractos

sobre el rendimiento productivo de los pollos (índice de conversión, velocidad de crecimiento y peso al sacrificio). Los extractos de pimienta causaron actividad antimicrobiana sobre *Enterococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Staphylococcus*.

Gölcü *et al.*, (2002), quienes evaluaron la actividad biológica de extractos etanólico y acuoso obtenidos por el método tipo Soxhlet de *Rubia tinctorium* L., sobre el crecimiento de *Aeromonas hydrophyla*, *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium xenosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *S. aureus*, mostrando una zona de inhibición de 7 a 21 mm, pero sin efecto sobre *E.coli*, considerando los extractos como desinfectantes y antisépticos.

El objetivo de esta investigación fue comparar el efecto inhibitorio de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de semillas de *Piper nigrum* L., contra el crecimiento de bacterias Gram positivas, empleando dos equipos de extracción (Goldfish y Soxhlet), que emplean diferentes cantidades de la especia como de solvente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de *Piper nigrum* L. perteneciente a la Familia Piperaceae, variedad Singapur se recolectaron en Río Caribe, Estado Sucre. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente bajo sombra, a 28°C durante 8 días, hasta obtener semillas de color negro. Las semillas secas se molieron con un martillo Willey provisto de una malla de 1mm.

Preparación de extractos

Se prepararon extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos por el método de reflujo empleando los equipos Goldfish y Soxhlet, utilizando 3 y 30 g de pimienta negra molida, así como 30 y 200 mL de cada uno de los solventes, respectivamente, tal como lo indican los manuales. El reflujo se realizó por 6 horas manteniendo la temperatura de extracción a 100°C para los distintos solventes en el caso del Goldfish. Con Soxhlet se emplearon 100°C, 60°C y 78 °C para los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico respectivamente, por el mismo tiempo.

Actividad antimicrobiana

Para medir el efecto antibacteriano se utilizaron bacterias Gram positivas; *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus* sp, *Bacillus cereus*, mediante el método de difusión en placa de agar. Se evaluaron cuatro tratamientos (la combinación de los dos equipos, *id est*, Goldfish y Soxhlet y tres solventes, *id est*, agua, etanol y cloroformo.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con tres repeticiones. Para evaluar las diferencias entre los cinco tratamientos se aplicó la prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey a un nivel de significación de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de semillas de *Piper nigrum* L., los cuales refieren que al emplear Goldfish y etanol se observó un mayor halo de inhibición (18mm) para *Bacillus cereus*. Para *Streptococcus* spp., el mayor halo (13mm) se obtuvo empleando etanol y Soxhlet.

Cuadro 1. Diámetro de inhibición máxima (mm) de extractos acuosos, etanólicos y clorofórmicos de pimienta (*Piper nigrum* L.) sobre las bacterias Gram positivas *Enterococcus* spp. (E), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus* spp. (S), *Bacillus* sp. (B) y *Bacillus cereus* (Bc) utilizando Goldfish y Soxhlet.

Bacterias	Diámetro de inhibición máxima (mm)*								
	Método Goldfish			Método Soxhlet			Solvente (sin extractos)		
	EA	EE	EC	EA	EE	EC	A	ET	C
E	--	12	--	--	12	11	--	--	--
Sa	--	15	--	--	--	11	--	--	--
S	--	--	11	--	13	--	--	--	--
B	--	15	--	--	12	11	--	--	--
Bc	--	18	--	--	12	--	--	--	--

EA: Extracto acuoso; EE: Extracto etanólico; EC: Extracto clorofórmico; A: Agua destilada; C: Cloroformo al 99,4%; ET: Etanol al 99,8%; -- Negativo (sin halo de inhibición).

El extracto clorofórmico obtenido en ambos equipos provocó una inhibición de menor tamaño (11mm) para la mayoría de las bacterias. Aunque con Goldfish se reportaron los mayores halos de inhibición, solo fueron obtenidos con etanol, mientras que con el método de Soxhlet se logró obtener inhibición tanto con etanol como con cloroformo, lo que demuestra que mientras mayor es la cantidad de muestra empleada, mayor será también la cantidad del principio activo extraído.

El extracto acuoso obtenido por los métodos de Goldfish y Soxhlet, no reportó inhibición sobre *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*. Se esperaba que al ser el agua empleada en la mayoría de los productos alimenticios como parte de los líquidos de cobertura o en alguna de las etapas de los procesos tecnológicos, se podría emplear como solvente para la extracción de alguno de los compuestos presentes en la pimienta, sin embargo los resultados demostraron lo contrario. Es posible que este solvente no permite una disolución de los compuestos bioactivos de las semillas analizadas o de ser solubles, la concentración en la cual se encuentran es muy baja para provocar una efecto antimicrobiano.

En el cuadro 2 se muestran los resultados del efecto inhibitorio de los extractos etanólico y clorofórmico obtenidos empleando los equipos Goldfish y Soxhlet, medido como el halo de inhibición sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas; *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*. El extracto acuoso obtenido en ambos equipos no presentó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias estudiadas.

El análisis de promedios determinó que el extracto etanólico obtenido por Goldfish tuvo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento sobre *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*, superando a los resultados del extracto clorofórmico obtenidos por ese mismo método, para el mismo grupo de microorganismos. Para *Streptococcus* spp., se observó mayor inhibición con el extracto clorofórmico. Para los extractos obtenidos por Soxhlet se observó mayor inhibición del extracto etanólico sobre el crecimiento de *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*. En el caso de *S. aureus* el extracto clorofórmico fue el que causó mayor inhibición. Estos resultados indican que existen diferencias significativas entre los extractos y los equipos de extracción sobre el crecimiento de las bacterias ($p \leq 0,05$).

Aún cuando el tiempo de extracción fue igual en ambos equipos, se puede inferir que existe una especificidad de los extractos la cual está influenciada por la cantidad de muestra empleada y el volumen de solvente utilizado. El método de reflujo se basa en obtener metabolitos según la solubilidad de estos compuestos en el solvente. Sin embargo, de los resultados obtenidos en esta investigación se puede inferir que con el equipo Goldfish, posiblemente por emplear un reflujo continuo, se disminuye la pérdida de solvente y con ello los compuestos volátiles, mientras que en Soxhlet, su reflujo discontinuo, puede inducir a una pérdida de los compuestos presentes en la muestra a evaluar.

Los halos de inhibición encontrados en esta investigación son menores a los reportados por Gölcü *et al.*, (2002) en sus estudios de extractos etanólico (11-16mm) y acuoso (12-20mm) obtenidos por el

Cuadro 2. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación de Tukey para el halo de inhibición de *Enterococcus* spp. (E), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Streptococcus* spp. (S), *Bacillus* sp. (B) y *Bacillus cereus* (Bc) causado por los extractos etanólico y clorofórmico de semillas de pimienta (*Piper nigrum* L.) obtenidos por Goldfish y Soxhlet.

Método de extracción	Bacterias				
	<i>Enterococcus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
Goldfish etanólico	19,0 A †	21,0 A	9,0 B	19,5 A	21,5 A
Soxhlet clorofórmico	9,7 AB	14,0 AB	9,0 B	9,5 B	8,5 B
Goldfish clorofórmico	6,5 B	9,0 B	12,5 B	8,0 B	8,5 B
Soxhlet etanólico	14,8 AB	9,0 B	19,5 A	12,9 AB	11,5 B

H de Kruskal Wallis ($p \leq 0,05$)

† Comparación Múltiple de Tukey. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de los rangos ($p \leq 0,05$) dentro de una misma columna

método tipo Soxhlet de *Rubia tinctorium* L. sobre diversos microorganismos. De igual forma coinciden con los reportados por Sağdıç *et al.*, (2002) en su estudio con extractos metanólicos de especias turcas, a cuatro diluciones diferentes, encontraron que el diámetro de inhibición para el comino (*Cuminum cyminum*) estuvo entre 15 -17mm, *Hlichrysum compactum* Boiss (HC) (21-28mm), laurel (*Laurus nobilis* L.) (0 mm), mirto (*Myrtus communis*) (29-35mm), orégano (*Origanum vulgare* L.) (26-30mm), salvia (*Salvia officinalis* L.) (32-34mm) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) (34-42mm), obtenidos por Soxhlet sobre el crecimiento de *E. coli* 0157:H7; demostraron un efecto antibacterial del tomillo. Este efecto antimicrobiano puede ser debido al contenido de aceites esenciales presentes en las especies estudiadas, como el thymol y carvacrol y probablemente a compuestos no volátiles.

Los resultados presentados en el cuadro 2 de esta investigación demuestran que estadísticamente, los extractos obtenidos por Goldfish fueron estadísticamente más significativos para la mayoría de las bacterias evaluadas, excepto para *Streptococcus* spp., donde Soxhlet fue estadísticamente superior. Los estudios realizados por Gölcu *et al.*, (2002) y Sağdıç *et al.*, (2002) sobre efecto antimicrobiano de extractos de vegetales sobre el crecimiento de microorganismos, a pesar de que muestran un efecto positivo del método tipo Soxhlet sobre la actividad biológica en bacterias, no es comparado con otros equipos de extracción.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación difieren con los reportados por Águila *et al.*, (2000) quienes en un estudio preliminar con extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. observaron propiedades bactericidas de los extractos sobre *Staphylococcus aureus* y *S. fecalis*, además determinaron la presencia de flavonoides, saponinas, polisacáridos, aminoácidos y taninos.

Compuestos con actividad antibacterial han sido reportados por varios investigadores particularmente, Barre *et al.*, (1997), Djoukeng *et al.*, (2005), Reddy *et al.*, (2001), señalan en sus estudios que los triterpenos provenientes de *Lantana camara* inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*; mientras que los triterpenos extraídos de *Syzygium guineense* inhibieron el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *Shigella sonnei*.

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los reportados por Cabello *et al.*, (2007) para bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Proteus* sp.), cuando evaluaron extractos etanólico y clorofórmico de pimienta negra (*Piper nigrum* L.). Ellos indican en ese estudio que el método Goldfish empleando etanol tuvo mayor efecto inhibitorio para ambas bacterias, y el mayor halo de inhibición (15mm) se observó en *E. coli*, mientras que para *Proteus* sp. fué de 13mm. Solo encontraron efecto inhibitorio del extracto clorofórmico obtenido por Soxhlet para *E. coli* y *Proteus* (11 y 12 mm) respectivamente.

Los resultados positivos de inhibición con el extracto clorofórmico de semillas de pimienta también coinciden con los reportados por Natarajan *et al.*, (2005) quienes encontraron halos de inhibición entre 7 y 12 mm en bacterias Gram positivas y Gram negativas cuando fueron tratadas con extracto clorofórmico de rizoma y hojas de *Euphorbia fusiformis*.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico obtenido de semillas de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) utilizando el método de Goldfish causó mayor efecto sobre la mayoría de las bacterias Gram positivas estudiadas, particularmente se observó el mayor halo de inhibición en *Bacillus cereus* (18 mm).

El halo de mayor inhibición (13 mm) para *Streptococcus* spp., lo causó el extracto etanólico obtenido de las semillas de pimienta negra (*Piper nigrum* L.) empleando el método de Soxhlet.

El efecto del extracto clorofórmico de semillas de pimienta empleando los métodos de Goldfish y Soxhlet, fue menos efectivo que el extracto etanólico, los halos de inhibición oscilaron entre 11 y 13 mm.

El extracto acuoso obtenido empleando Goldfish y Soxhlet no presentaron halos de inhibición, sobre el crecimiento de las bacterias Gram positivas estudiadas.

LITERATURA CITADA

Águila, B.; R. Menéndez; C. González y D. Fernández. 2000. Extracto acuoso de *Calendula*

- officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev. Cubana Plant Med 5 (1): 30-31.
- Apecechea, M.; M. Larionova, S. Salazar y G. Montalbán. 2000. Evaluación de la actividad antiulcerosa del 2"-0-ramnosil 4"-0-metil vitexina de las hojas de *Piper Ossanum*. Rev Cubana Med Milit 29 (2): 114-117.
- Barre, J. T.; B. F. Bowden, J. C. Coll, J. DeJesus, V. E. De La Fuente, G. C. Janairo and C. Y. Ragasa. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. Phytochemistry 45 (2): 321-324.
- Bonafine, O.; A. Cañizares y D. Laverde. 2006. Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. INIA. Divulga 7: 9-12.
- Bruneton, J. 2001. Plantas tóxicas. Vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Zaragoza. Editorial ACRIBIA. España. 527 p.
- Cabello, M.; G. Beloso, J. Colivet y J. Méndez. 2007. Actividad inhibitoria de los extractos acuosos, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 24 (Supl. 1): 355-359.
- Cunico M.; J. Carvalho, V. Kerber, C. Higaskino. S. Cruz, M. Miguel y O. Miguel. 2004. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 14 (2): 97-103.
- Djoukeng J. D. ; E. Abou, R. Tabacchi, A. L. Taponjoui, H. Bouda and J. D. Lontsi. 2005. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). J of Ethnopharmacology 101: 283-286.
- Garcés C.; M. Soler y J. Barragán. 2005. Evaluación del uso de extractos vegetales en la alimentación de pollos de carne. Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica. XLII Symposium Científico de Avicultura. p. 161-169.
- Gölcü A.; M. Dolaz, M. Diğrak, and S. Serin. 2002. The biological activity of dyer's madder (*Rubia tinctorium* L). Proceedings of ICNP- Trabzon/Turkiye. p. 255-258.
- Kamel, C. 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. The International J. on Feed, Nutrition and Technology 8 (3): 16-18.
- Martínez L.; I. Cilla, J. Beltran and P. Roncales. 2006. Effect of *Capsicum anuum* (Red sweetand cayenne) and *Piper nigrum* (Black and White). Pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. J. Food Sci. 71 (1): 48-53.
- Natarajan D.; S. John, K. Srinivasan, N. Nagamurugan, C. Mohanasundari and G. Peruma. 2005. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis* – A rare medicinal herb. J. Ethnopharmacology 102: 123-126.
- Reddy P.; K. Jamil, P. Madhusudhan, G. Anjani and B. Das. 2001. Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. Pharmaceutical Biology. 39 (3): 236-238.
- Sazdic, O.; A. Kuscu, M. Özcan and S. Özcelik. 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7. Food Microbiology 19: 473 – 480.
- Sharma A.; S. Ghanekar, S. R. Padwal-Desai and G. B. Nadkarni. 1984. Microbiological status and antifungal properties of irradiated spices. J Food Chem 32: 1062-1063.