

## ASPECTOS DE LA CAPACIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS NATURALES Y ACIDOS ORGANICOS

C.M. SHIVA RAMAYONI y M<sup>a</sup> A. CALVO TORRAS

En muchas partes del mundo existe una amplia tradición en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a que muchas de ellas poseen actividad antibacteriana y antifúngica.

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

Se conocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos (Gould, 1996).

### ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los extractos de plantas se han venido utilizando durante siglos para el tratamiento de muchos procesos patológicos.

Si nos remontamos a la Historia, el descubrimiento de un hombre congelado en los Alpes de más de 5.300 años de antigüedad, perfectamente conservado y que tenía entre sus bienes, varios frutos de *Piptous betulinus*, de reconocida actividad antifúngica, antiparasitaria y frente a especies del género *Mycobacterium* (Capasso, 1998) nos aporta una idea del conocimiento empírico por parte del poblador de aquellas épocas sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas.

El primer texto escrito sobre plantas medicinales data del año 3.000 a. de Cristo y se debe a los Sumerios (Costa *et al.*, 1999). Más adelante, los griegos también emplearon las plantas en sus tratamientos. Dada la abundancia de vegetales en Creta, esta civilización, desempeñó un papel importante en el desarrollo de la medicina alrededor del mar Mediterráneo, especialmente entre los siglos I y II d.C., como principal exportador de plantas a los países del área del mediterráneo (Ramoutsaki *et al.* 2000). El primer tratado Helénico completo en materia de plantas medicinales del que se tiene conocimiento fue escrito por Diocles de Carystos (Siglo IV d.C.). El tratado llamado

Phizotomicon, expone el origen, el reconocimiento y el valor medicinal de diversas plantas.

El descubrimiento del nuevo Continente y la extensión de los Imperios Europeos por África y Oriente aportaron un sin número de nuevas plantas con propiedades medicinales por lo que se extendió su uso terapéutico para el tratamiento de múltiples enfermedades. Estas plantas se consumían de las formas más variadas: infusiones, vapores, ingesta directa, entre otras.

Probablemente una de las primeras drogas del folklore herbolario que se transformó en una moderna droga allá por finales del siglo XVIII, fue la digital (*Digitalis purpurea* L.), lo cual ilustra los principios de la farmacología moderna (Goldman, 2001).

Posteriormente se inició la era de la quimioterapia moderna, cuando en 1.928 Sir Alexander Fleming del Mary's Hospital de Londres evidenció que una sustancia producida por el hongo *Penicillium notatum* que había contaminado una placa con crecimiento de *Staphylococcus aureus*, inhibía el desarrollo de esta bacteria (Moellering, R. 1995; Witte, W. 2000a). Como consecuencia de este descubrimiento, la fitoterapia se dejó de lado especialmente en los países desarrollados y en contraposición, la quimioterapia tuvo un desarrollo meteórico con el descubrimiento de nuevos antibióticos casi siempre aislados, purificados y procesados industrialmente a partir de fuentes naturales (Harvey, A.L., 1993). El uso de antibióticos se hizo extensivo especialmente en producción animal con mayor auge en explotaciones porcinas y avícolas en las que no sólo se empleaban para tratar patologías sino que se adicionaban rutinariamente a los piensos, como promotores de crecimiento.

## RESISTENCIA BACTERIANA

Con la aparición cada vez mayor de casos de resistencia bacteriana en humanos, y también en producción animal debido al uso indiscriminado de antibióticos, muchos países y especialmente la Unión Europea ha ido prohibiendo paulatinamente el uso de éstos como promotores de engorde, en el intento de controlar la citada transferencia (Witte *et al*, 2000b).

La microbiota intestinal debido a su alta concentración, facilita la transferencia de resistencias entre bacterias, en el caso de animales estos genes de resistencia pueden ser diseminados fácilmente en el hato por contacto fecal. La resistencia de los microorganismos puede alcanzar al hombre directamente, a través de tratamientos e indirectamente por el consumo de carne y sus productos (Stobberingh, E.E., 2000)

Las bacterias de la microbiota endógena de los animales de consumo podrían colonizar y transferir genes de resistencia a la microbiota endógena humana e incrementar en una carga adicional el reservorio de resistencia ya presente en el hombre (Bates *et al.*, 1994; Witte, W., 2000a).

A raíz de estos problemas de transferencia de resistencia a los antibióticos se han ido planteando diversas alternativas a los ya clásicos promotores de crecimiento con capacidad antibiótica, resurgiendo algunos, como los ácidos orgánicos que venían siendo utilizados como antifúngicos en piensos, especialmente el ácido propiónico. Otra

alternativa es el empleo de extractos naturales que aunque se emplean a menor escala que los ácidos orgánicos, han demostrado una marcada actividad antimicrobiana sólo en combinaciones con los ácidos inorgánicos, con los que presentan sinergismos.

## EXTRACTOS NATURALES

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, R.H., 2001; Smith-Schalkwijk, M.J., 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, por ejemplo sobre el sistema enzimático, mejorando el apetito y optimizando la absorción de nutrientes (Kamel, C., 2002).

Los principios activos de las plantas suelen ser: aceites esenciales (volátiles), resinas, alcaloides glicósidos y aceites fijos.

## ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos químicos que forman las esencias odoríferas de un gran número de vegetales, se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. (Peris, S y Asensio, J. J., 2001; San Martín, R., 1977). Se pueden aislar de diferentes partes de la planta:

- En las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.).
- En las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.).
- En el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.).
- En las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.).
- En el tallo (canela, caparrapí, etc.).
- En las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.).
- En los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.).

Los aceites se originan en las partes verdes del vegetal y al crecer la planta son transportados a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor. Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; unas teorías indican que sirven para atraer a los insectos en vías a la polinización, otras que para repeler a los insectos nocivos, o que podrían ser simplemente un producto metabólico intermedio.

## EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales y extractos aromáticos, se resumen en la Tabla 1.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante diferentes métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, *enfleurage* y con fluidos supercríticos.

En la expresión, el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos.

<i>Método</i>	<i>Procedimiento</i>		<i>Productos obtenidos</i>
<b>Métodos directos</b>	Expresión	Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
		Raspado de cáscaras	
	Exudado	Lesiones mecánicas en cortezas	Aromas, resinas, bálsamos
<b>Destilación</b>	Directa		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Por arrastre con vapor (directo, indirecto, a presión, a vacío)		
	Destilación-Maceración (liberación enzimática de aglicomas en agua caliente)		Almendras, mostaza, ajo, hojas de abedul
<b>Extracción con solventes</b>	Solventes volátiles	En caliente	Infusiones y resinoides alcohólicos en caliente, oleoresinas
		En frío	Concretos y absolutos, resinoides en frío, oleoresinas
	Solventes fijos (grasas y aceites)	En caliente	Pomadas en caliente, lavados y absolutos de pomadas
		En frío	Pomadas en frío, lavados y absolutos de enflorados
<b>Procesos de extracción con fluidos en condiciones subcríticas y supercríticas</b>			

TABLA 1. *Métodos de extracción de mezclas aromáticas (adaptado de San Martín, R., 1977)*

Entre los extractos naturales destacan un conjunto de aceites esenciales y extractos de plantas de la familia de las Rutaceae, específicamente obtenidos a partir de extractos de: *Citrus limonum*, *Citrus aurantium*, *Citrus bergamica* y *Barosma betulina*.

### Familia Rutaceae

**Tamaño:** 150 géneros, 1.500 especies.

**Distribución:** casi cosmopolita, la mayor parte tropical y subtropical y especialmente bien desarrollada en Sudáfrica y Australia.

Las tablas 2A, 2B, 2C y 2D nos muestran los principios activos de los extractos de rutáceas (Costa *et al*, 1999)

MONOTERPENOS	Limoneno, alfa y gamma terpinenos, paracimeno, alfa y beta felandrenos terpinoleno
SESQUITERPENOS	Beta bisaboleno
ALCOHOLES ALIFATICOS	Hexanol, octanol, nonanol, decanol
ALDEHIDOS	Hexanal, heptanal, octanal, nonanal, geraniol
CUMARINAS Y FURANOCUMARINAS	Escopoletina, umbeliferona, bergamotina, bergapteno, citropteno.
CITROFLAVONOIDES	Flavononas y algunas flavonas(Diosmósido, rutósido)

TABLA 2A. *Principios activos del aceite esencial del limón (Citrus limonum).*

MONOTERPENOS	Mirceno, cis y trans para-miceno, limoneno, linalol, alfa terpineol, citronelol, nerol, geraniol
ESTERES	Acetatos de geraniol, nerilo, citronelilo y linalilo
ALDEHÍDOS	Nonanal, decanal, undecanal, dodecanal, geranialeral, citronelal
CUMARINAS Y FURANOCUMARINAS	Aurapteno, auraptenol, bergapteno, bargaptol, escoparona, citropteno, umbeliferona
ÁCIDOS	Diversos ácidos amargos, cítrico y málico

TABLA 2B. *Principios activos del aceite esencial de la naranja amarga (Citrus aurantium).*

MONOTERPENOS	Limoneno, linalol, nerol, geraniol, alfa -pineno, beta-pineno, paracimeno, terpineol
SESQUITERPENOS	bergamotina, bargaptol, bergapteno
ALDEHÍDOS	Citral
ESTERES	Acetato de nerilo, acetato de citronelilo, acetato de geraniol

TABLA 2C. *Principios activos del aceite esencial de la Bergamota (Citrus bergamica).*

MONOTERPENOS	Limoneno
CETOALCOHOLES	Diosfenol
CETONAS MONOTERPÉNICAS	Mentona, isomentona, pulegona, isopulegona

TABLA 2D. Principios activos del aceite esencial del Buchu (*Barosma betulina*)

## ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos, están presentes en los alimentos o pueden acumularse como resultado de procesos de fermentación o bien se añaden de forma intencionada en la formulación (Beuchat, L.R. y Golden, D.A., 1989). Los rumiantes difieren de los no rumiantes en que en ellos, los microorganismos fermentan los alimentos y producen ácidos grasos volátiles de cadena corta que proveen la fuente primaria de energía que es absorbida y presentada al hígado. En el caso del ganado vacuno de leche suelen producirse diariamente hasta 1,5 litros de ácido propiónico por las bacterias fermentadoras del rumen (BASF, 1996). El ácido propiónico se absorbe por el hígado que lo metaboliza y da lugar a la glucosa, importante fuente de energía (Ralphs, M.H. *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1992).

En la Tabla 3 se indican los principales ácidos orgánicos de interés en el control antimicrobiano.

El uso de ácidos orgánicos de cadena corta (AOCC), como el ácido fórmico, el láctico o el ácido propiónico, éste último utilizado durante años como inhibidor de hongos en pienso, (Izat *et al.*, 1990; Dixon, R.C. y Hamilton, P.B., 1981) ha adquirido su mayor importancia en producción ganadera. Estos ácidos, poseen un valor de pKa elevado, este hecho es muy importante ya que en el rango habitual de pH de las dietas, la proporción más alta de ácidos se encuentra en su forma no disociada. Cuando los ácidos orgánicos se utilizan como aditivos alimentarios, se debe tener en cuenta también su aporte de energía bruta, que varía considerablemente entre los diferentes compuestos. Se considera que en la mayoría de los casos la energía bruta es completamente metabolizada por el animal.

La Tabla 4 resume las principales características de los ácidos orgánicos.

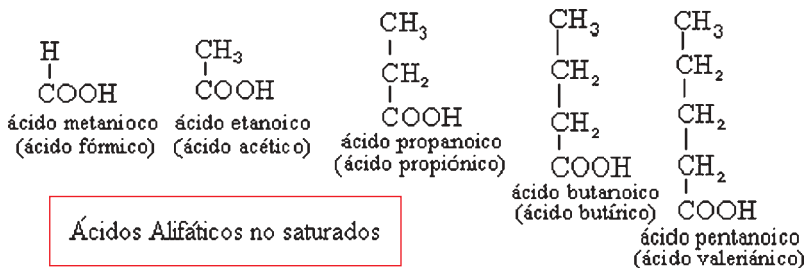


TABLA 3. Principales ácidos orgánicos de interés en el control antimicrobiano (Gillespie *et al.*, 1990).

Ácido	Form. empírica	pKa	solubilidad en H <sub>2</sub> O	E.B., Kcal/Kg
Fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,75	Muy buena	1.386
Acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4,75	Muy buena	3.537
Propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4,87	Muy buena	4,971
Láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3,08	Buena	3.609
Fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	3,0/4,4	Regular	2.748
Málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3,4/5,1	Buena	2,390
Tartárico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	3,0/4,4	Buena	1.864

E.B. = Energía bruta

TABLA 4. Características de los principales ácidos orgánicos (BASF, 2001).

En cuanto a los ácidos inorgánicos, podemos indicar que son ácidos fuertes ya que poseen un pH muy cercano a 1, pero se encuentran en estado completamente disociado a diferencia de los ácidos orgánicos que están en su mayoría en forma no disociada.

## MECANISMO DE ACCIÓN

Los ácidos orgánicos, ejercen su actividad antibacteriana principalmente en base a:

- Acidificación del medio extracelular y por ende determinando condiciones de supervivencia poco favorables para la mayoría de las bacterias.
- A partir de su forma no disociada, a) el hidrogenión (H<sup>+</sup>) reduce el pH del citoplasma, lo que obliga a la célula a incrementar sus gastos energéticos a fin de mantener su equilibrio osmótico (Salmond *et al.*, 1984) y b) el anión (A<sup>-</sup>) perjudica la síntesis de DNA, evitando la replicación de los microorganismos (Cherrington *et al.*, 1990, 1991; Young, 1993). En consecuencia, es más interesante la adición de ácidos orgánicos de cadena corta con un pKa superior al pH fisiológico ya que permite que una mayor cantidad de ácido en forma no disociada penetre en el interior del microorganismo.
- Como se sabe la forma disociada de los ácidos es un anión, por tanto no atraviesa la membrana plasmática de los microorganismos. En cambio la forma no disociada de los ácidos si la atraviesa, una vez en el interior, el ácido puede disociarse y afectar directamente al pH intracelular de la bacteria, altera el metabolismo bacteriano, por lo que la bacteria aumenta sus niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y/o glutamato para compensar el aumento de aniones de los ácidos, esto conlleva a un aumento de la fuerza iónica intracelular y del turgor. Este mecanismo ejerce una presión mecánica sobre la pared del microorganismo, que determina que eventualmente pueda estallar.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado su actividad sobre bacterias Gram negativas y en menor medida sobre Gram positivos (Östling, C.E. y Lindgreen, S.E., 1993; Hinton, M. y Linton, A.H., 1988)

Paralelamente, se han descrito, diversos beneficios a nivel digestivo derivados de la presencia de los ácidos orgánicos y entre ellos citaremos la disminución del pH

estomacal (BASF, 2001) en este caso al acidificar el pienso de los lechones, se reduce el pH de la dieta y su capacidad tampón. Para la digestión óptima de las proteínas en el intestino, se requiere la conversión de pepsinógeno en pepsina, para ello es necesario que el pH sea menor a 5,0, por otra parte la pepsina alcanza su máxima actividad a un pH comprendido entre 2,0 y 3,5 (Murray, 1992). En caso de lechones, al no tener bien desarrollada la digestión enzimática ni la producción de ácido clorhídrico a nivel de estómago, puede llevar a problemas de digestibilidad y diarreas.

## BIBLIOGRAFÍA

- BASF. 1996. Sobre el tema de los aditivos para la alimentación animal, información Técnica. Edición 97/98.
- BASF. 2001. Ácidos orgánicos en la producción animal. Mesa redonda. Lérida
- Bates, J., Jordens, J.Z., and Griffiths, D.T. 1994. Farms animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infection in man. *Jour. Antim. Chem.* 34: 507-516.
- Beuchat, L.R. and Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology.* 1: 134-142.
- Capasso, L.A. 1998. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *The Lancet* 352 (5): 1864
- Cherrington, C. A., Hinton, M. y Chopra, I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bact.* 68: 69-74
- Cherrington, C.A., Hinton, M., Pearson G.R. y Chopra, I. 1991. Inhibition of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bact.* 70: 156-160
- Costa, P., Salado, S., Medel, P. y Asensio, B. 1999. Productos naturales de origen vegetal: Una alternativa a los aditivos antimicrobianos en Alimentación Animal. *Ana-porc.* 144: 27-34.
- Cutter, C.N., 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *J. Food Prot.* 63 (5): 601-607.
- 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
- Dixon, R.C., and Hamilton, P.B. 1981. Effect of feed ingredients on the antifungal activity of propionic acid. *Poultry Science* 60: 2407-2411.
- Gillispie, R.J., Humphreys, D.A., Baird, N.C. y Robinson, E.A. 1990. *Química*. Editorial Reverte. Barcelona.
- Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. Supplement:* 82-86.
- Harvey, A.L. 1993. *Drugs from natural products: pharmaceuticals and agrochemicals*. Ed. Ellis Harwood Limit. England.
- Hinton, M. y Linton A.H. 1988. Control of *Salmonella* infections in broilers chickens by the acid treatment of their feed. *Veterinary Record.* 123: 416-421.
- Izat, A.L., Tidwell, R.A., Thomas, R.A., Reiber, M.A., Adams, M.H., Colberg, M. y Waldroup, P.W. 1990. Effects of a buffered propionic acid in diets on the performance of broiler chickens and on microflora of the intestine and carcass. *Poultry Science* 69: 818-826.
- Jeffrey, J.S., Kirk, J.H., Atwill, E.R., y Cullor, J.S., 1998. Prevalence of selected microbial pathogens in processed waste used as dairy cattle feed. *Poultry Science* 77, 808-811.
- Kamel, C., 2002. Re-defining botanicals. *Feed International.* 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: 2839-2845.
- Lis-Balchin, M., Buchbauer, G., Hirlenleher, T., y Resh, M., 1998. Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Appl. Microbiol.* 27: 207-210.
- Lynn, T.V., Hancock, D.D., Besser, T.E., Harrison, J.H., Rice, D.H., Stewart, N.T., y Rowan, L.L., 1998. The occurrence and replication of *Escherichia coli* en cattle feeds. *J. Dairy Sci.* 81: 1102-1108.
- Mau, J.-L., Chen, C.-P., Hsieh, P.-C., 2001. Antimicrobial of extracts from Chinese chive, Cinnamon and Corni fructus. *J. Agric. Food Chem.* 49: 183-188.
- Moellering, R. 1995. Past, Present and Future of Antimicrobial of medicine. *Am. Jour. Med.* 99 (6A) supplement 1: 11S-18S.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. y Rodwell, V.W. 1992. *Bioquímica de Harper* 2ª Edición. Mexico D.F.
- Östling, C.E. y Lindgren, S.E. 1993. Inhibition of *Enterobacteria* and *Listeria* growth by Lactic, Acetic and Formic Acids. *J. of Appl. Bact.* 75: 18-24
- Peris, S. y Asensio, J.J. 2002. Organic acids plus botanicals. *Feed International*. March: 17-19
- Poppenga, R.H. 2001. Risk associated with the use of herbs and other dietary supplements veterinary. *Clinics of North American Equine Practic.* 17 (3): 455-477
- Ralphs, M.H., Provenza, F.D., Wiedmeier, R.D. y Bunderson, F.B. 1995. Effects of energy source and food flavour on conditioned preferences in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1651-1657.
- Ramoutsaki, I., Ramoutsakis, Y.A., Hankotakis, S. y Tsatsakis, A.M. 2000. Remedies used in Hellenic history. *Vet Human Toxicology.* 42 (4): 238-241
- Ross, Z.M., Gara, E.A.O., Hill, D.J., Sleightholme, H.V. y Maslin, D.J. 2001. Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria.: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulphides and garlic powder. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1): 475-480.
- Salmond, C.V. Kroll, R.G. y Booth, I.R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Jour. Gen. Microbiol.* 130 (11): 2845-2850.
- San Martin, R. 1977. *Tratado de Farmacognosia*. Ed. Científico Médica. España.
- Smith-Schalkwijk, M.J. 1999. Veterinary Phytotherapy: an overview. *Can. Vet.* 40: 891-892.
- Stobberingh, E.E. y van den Bogaard, A.E. 2000. Spread of antibiotic resistance from food animals to man. *Acta Vet. Scand.* 93: 47:52
- Vargas, I., Sanz, I, Moya, P. y Primo-Yuferá, E. 1999. Antimicrobial and antioxidant compounds in the non volatile fraction of expressed orange essential oils. *J. of Food Prot.* 62 (8): 929-932.
- Veldman, A., Vahl, H.A., Borggreve, G.J., Fuller, y D.C., 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. *Veterinary Records* 136, 169-172.
- Witte, W. 2000a. Antimicrobial therapy in a Historical perspective. *Acta Vet. Scand.* 93: 7-16.
- Witte, W., Tschäpe, H., Klare, I. y Werner, G. 2000b Antibiotics in animal feed. *Acta Vet. Scand.* 93: 37-45
- Young, K.M. and Foegeding P.M. 1993. Acetic, Lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott and the effect on intracellular pH. *Jour. Appl. Bacteriol.* 74: 515-520.