# خواص فیتوشیمیایی و ضد باکتریایی اسانس گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) به روش میکرو دایلوشن

**مهدیه شفقت[۱]، شهلا نجفی*[۲]، رویا رضوی زاده[۳]**

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان
۲- استادیار، گروه زیست شناسی- دانشکده علوم-دانشگاه زابل
۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور

***نشانی برای مکاتبه:** زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه - صندوق پستی : ۹۸۶۱۳۳۵۸۵۶، تلفن ۰۵۴۲۴۸۲۲۱۸۰، Najafi_sh2003@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود و سه پذیرش برای چاپ: شهریور نود و سه

## چکیده

***سابقه و هدف:*** *گیاهان خانواده چتریان از جمله جنس زنیان حاوی ترکیب‌هایی هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از جمله خاصیت ضدمیکروبی را نشان می‌دهند. این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی اسانس گیاه زنیان انجام گرفت.*

***روش کار:*** *اسانس گیاه دارویی زنیان (Carum copticum) به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. اسانس به دست آمده با استفاده از گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد و اجزاء آنها بر اساس شاخص بازداری و طیف جرمی تعیین گردید. سپس با استفاده از روش میکرو دایلوشن خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاه با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) علیه باکتری های اشرشیاکلی (ATCC۱۱۳۰۳) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC۹۱۴۴) بررسی شد.*

***یافته ها:*** *نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس بذر زنیان بومی منطقه سیستان به روش(GC/MS) تعداد ۲۱ ترکیب را در این گونه نشان داد، که تیمول (۲۳/۳ درصد)، پاراسیمن (۱۷/۵ درصد)، گاما ترپینن (۱۶/۸ درصد) ترکیبات عمده آن را تشکیل می دادند. MIC این‌گونه علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ۱/۸۷ میلی‌گرم میلی‌لیتر و علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی ۳/۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.*

***نتیجه گیری:*** *تیمول موجود در ترکیبات اسانس گیاه زنیان نقش مهمی در خاصیت ضدمیکروبی این گیاه دارد.*

***واژگان کلیدی: اسانس، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، گیاه زنیان، تکنیک میکرو دایلوشن (ریز رقت)***

### مقدمه

قدمت شناخت خواص دارویی گیاهان شاید بیرون از حافظه تاریخ باشد. مردم از دوران‌های ماقبل تاریخ، ضمن استفاده از گیاهان برای تغذیه یا سوخت، به انواعی برخورد می‌کردند که مصرف آن‌ها آثار مختلفی داشت و این خود باعث شد که در طی زمان طولانی، به طور تصادفی گیاهانی با اثر مقوی معده، مخدر، مسهل و غیره کشف شود و از آن‌ها جهت درمان بیماری‌ها استفاده گردد. افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده نابجا و نامناسب و بیش از حد نیاز و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها شده است(۱). این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیب‌های جدید ضدمیکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است(۲). متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی(۳) از نظر اثرات ضدمیکروبی بررسی شده اند و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص حشره کشی، ضدقارچی، ضدانگل، ضدباکتری، ضدویروس، آنتی اکسیدانی و سیتوکسیک می‌باشند(۴).

زنیان با نام علمی (*Carum copticum*) گیاهی است از خانواده چتریان (Apiaceae) و جزو پیشرفته‌ترین گیاهان گل دار نهان دانه اولیه، علفی، یک ساله، بی کرک، ساقه ایستاده و به ارتفاع ۳۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر، برگ ها دارای پهنک منقسم، بریدگی زیاد و نازک، گلها سفید به صورت چترمرکب، برگ‌های بالایی ساقه کوچک شده، چترها با دم گل آذین کم وبیش بلند، گلبرگ‌ها سفید، میوه کوچک، بیضوی، به رنگ قهوه ای مایل به زرد، دارای بویی شبیه تیمول می‌باشد. قسمت مورد استفاده میوه گیاه است(۵). منشا زنیان شبه قاره هند و منطقه مدیترانه می باشد. در هند، پاکستان، ایران، مصر و... می‌روید. در جنوب ایران در استان‌های سیستان و بلوچستان، خوزستان و فارس به صورت طبیعی وجود دارد و کشت می شود(۶). گیاهان خانواده چتریان از جمله جنس زنیان حاوی ترکیب‌هایی هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی از جمله خاصیت ضدمیکروبی را نشان می‌دهند(۸ و ۷). در بسیاری از گیاهان تیمول و کاروکرول و در مواردی پارا-سایمن مهم ترین اجزا موثر در فعالیت ضدمیکروبی اسانس

گیاهان می باشند. از آنجا که تیمول و پارا-سایمن اجزا اصلی تشکیل دهنده اسانس گیاه زنیان می‌باشند، می‌توان فعالیت ضدمیکروبی اسانس را به این ترکیبات نسبت داد(۹). گیاه زنیان در طب سنتی به عنوان باد شکن، ضد تهوع، ملین، کرم کش، کاهش دهنده‌ی کلسترول خون، خلط آور و تقویت کننده معده، اشتها آور و از بین برنده بوی بد دهان استفاده می‌شود(۵). مطالعات انجام شده در مورد خواص ضدمیکروبی گیاهان خانواده چتریان نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی متوسط تا قوی این گیاهان است. Gachkar و هم کاران(۱۰) گزارش دادند که اسانس زیره سبز علیه *E.coli*، *S.aureus*، *L.monocytog* موثرتر از اسانس اکلیل کوهی است. Singh و هم کاران(۱۱) خواص ضدباکتریایی اسانس ۷ گونه از خانواده چتریان را علیه *Corynebacterium diphtheriae*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus hemolyticus*، *Echerichia coli*، *Klebsiella spp*، *Proteus vulgaris* بررسی و نتیجه گرفتند که اسانس زنیان بسیارموثر است. Rani و Khullar (۱۲) نشان دادند که عصاره زنیان علیه *Salmonella typhi* بسیارموثرتر از زیره سبز است.

با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌های مصرفی و مقاومت تعدادی از سویه‌های باکتریایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در برابرآن‌ها، به عمل کرد ضدمیکروبی عصاره‌ها و ترکیبات طبیعی استخراج شده از گونه‌های مختلف گیاهی توجه زیادی شده است. بدین ترتیب شناسایی تعداد بیشتری گیاهان دارای خاصیت ضدمیکروبی و جداسازی و خالص سازی ترکیبات موثر آن‌ها در درمان بیماری‌های عفونی می‌تواند یکی از راههای موثر و مفید در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها به‌شمار آید. گیاه زنیان یکی از گیاهان دارویی است، که می‌توان به عنوان عامل ضدباکتری به کار رود. نظر به اینکه زنیان بومی منطقه سیستان، یکی از ناشناخته‌ترین گیاهان دارویی کشورمان می‌باشد، تحقیق حاضر بر آن بوده است تا اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه را مورد مطالعه قرار دهد.

## روش کار

زنیان(*Carum copticum*) درتیرماه سال ۹۲از منطقه سیستان جمع آوری و سپس در هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه زابل شناسایی گردید. برای استخراج اسانس با روش تقطیر با آب از بذرگیاه ۳۰ گرم دانه خشک که کاملا پودر شده بودند هم راه با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون بالن ۵۰۰ سی‌سی استفاده و مدت چهار ساعت حرارت داده شد. در اثر حرارت، فشار بخار آب افزایش می‌یابد و غده‌های حاوی اسانس شکسته شده و اسانس هم راه با بخار آب وارد مبرد می‌شود. در مبرد عمل میعان صورت گرفته و قطرات اسانس درون آب به صورت دو فاز مشخص به طرف لوله مدرج حرکت می‌کند که به دلیل سبک تر بودن اسانس نسبت به آب، اسانس روی آب تجمع پیدا می‌کند و آب اضافی از طریق لوله رابط به بالن بازمی‌گردد. برای جمع آوری اسانس، شیر دستگاه را باز کرده تا آب خارج شده و سپس اسانس داخل بطری‌های کوچک که از قبل با ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ وزن شده بودند جمع‌آوری شد(۱۳).

برای جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها حجم یک میکرولیتر از هریک از اسانس‌های استخراج شده به دستگاه GC/MS ( با مشخصات: مدل Hewlett Packard (HP) 6890، درجه حرارت محل تزریق : ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، برنامه ریزی حرارتی: ۲۲۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد، نوع ستون: HP-5MS، گاز حامل: هلیوم، سرعت جریان گاز: ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، طول ستون: ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرون و دستگاه MS : مدل دستگاه HO-5973، انرژی یونیزاسیون 70eV ) در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تزریق شد. شناسایی ترکیبات با توجه به الگوی خروج پیک‌ها، شاخص بازداری آنها و تطبیق آنها با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه کامپیوتری انجام شد.

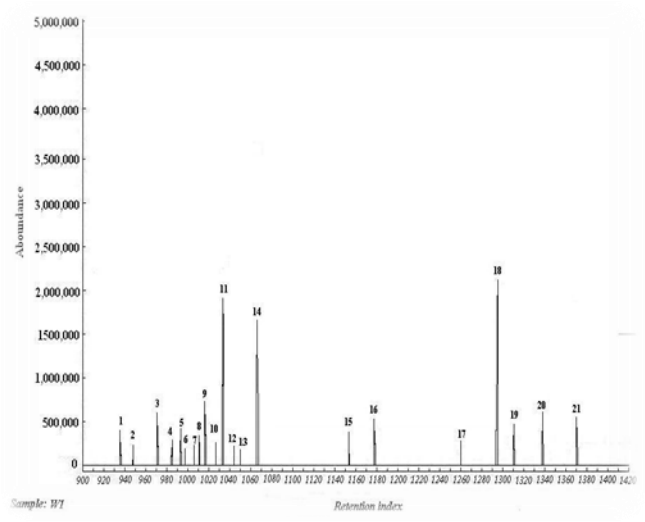
به منظور بررسی اثر ضدمیکروبی هر یک از اسانسهای استخراج شده، سویه استاندارد میکروبی *Escherichia coli* (ATCC11303) و *Staphylococus aureus* ( ATCC9144) از شرکت پادتن طب تهیه شد.

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار آگار مغذی (مرک آلمان) تلقیح شد. پس از رشد کلنی‌های باکتری، سطح محیط کشت با محیط نرمال سالین شسته شد و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری، داخل لوله استریل درب دارحاوی نرمال سالین ریخته شد و کدورت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه-گیری شد و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند، با نرمال سالین رقیق و سوسپانسیون باکتری با غلظت $1/5\times 10^8$ CFU/ml تهیه گردید.

حساسیت هرسویه از باکتری‌های مورد نظر دارای مقاومت چندگانه، نسبت به گیاه زنیان با استفاده از روش رقیق سازی در محیط مایع در پلیت های ۹۶ خانه ای ته گرد بررسی شد. به خانه های ردیف اول پلیت فقط محیط کشت (کنترل منفی) و سوسپانسیون باکتری (کنترل مثبت) اضافه گردید. در ردیف بعدی به ۶ خانه از پلیت‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مایع مغذی مولر هینتون اضافه شد. به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس گیاه به غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شده و تا چاهک ششم به ترتیب غلظت‌های اسانس بارقت‌های ۱/۸۷- ۳/۷۵- ۷/۵- ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ریخته شد.به هر چاهک مقدار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. پس از آن پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد درگرم خانه قرار گرفت و کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی تعیین شد. اولین رقتی که توانست کم ترین میزان کدورت را نشان دهد به عنوان حداقل غلظت بازدارنده تعیین گردید. این آزمایش در سه تکرار جداگانه انجام و میانگین سه تکرار برای هر چاهک برای تعیین کم ترین غلظت بازدارنده رشد استفاده شد(۱۴).

## یافته ها

در بذر گیاه زنیان ۲۱ ترکیب استخراج شد. ۳عدد از ترکیبات که بیش از ۵۰ درصد از کل اسانس را تشکیل می‌دادند شناسایی گردید. عمده ترین ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس تیمول (۲۳/۳ درصد)، پاراسیمن (۱۷/۵ درصد)، گاما ترپینن (۱۶/۸ درصد) بود. ترکیب مهم دراسانس، تیمول می‌باشد که یک ماده ضدمیکروبی قوی است( نمودار ۱، جدول ۱). حساسیت گونه استافیلوکوک اورئوس نسبت به گیاه زنیان بیش از اشرشیاکلی بود. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در سویه استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC۹۱۴۴) در غلظت۱/۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در سویه اشرشیاکلی (ATCC۱۱۳۰۳) در غلظت ۳/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.




**نمودار۱- طیف GC/MS ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه زنیان حاصل از روش تقطیر با آب**

**جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده اسانس گیاه زنیان با روش GC/MS**

| Composition of essential compounds | Retention index | (شاخص بازداری) RI | درصد |
|---|---|---|---|
| α-Thujene | ۱ | ۹۳۶ | ۲/۹ |
| α-Pinene | ۲ | ۹۴۸ | ۱/۱ |
| Sabinene | ۳ | ۹۷۱ | ٤/٥ |
| ß-pinene | ٤ | ۹۸٥ | ۱/۲ |
| 3-octanone | ٥ | ۹۹۳ | ۲/۳ |
| Myrcene | ٦ | ۹۹۸ | ۰/۹ |
| 2-Caren | ۷ | ۱۰۰٦ | ۰/۸ |
| a-Phylandrene | ۸ | ۱۰۱۱ | ۱/٦ |
| α-Fenchen | ۹ | ۱۰۱٦ | ٥/۷ |
| α-Terpinene | ۱۰ | ۱۰۲۷ | ۱/۳ |
| p-cymene | ۱۱ | ۱۰۳٤ | ۱۷/٥ |
| b-phylandrene | ۱۲ | ۱۰٤۳ | ۱/۱ |
| Limonene | ۱۳ | ۱۰٥۰ | ۰/۹ |
| γ-Terpinene | ۱٤ | ۱۰٦٦ | ۱٦/۸ |
| Linalool | ۱٥ | ۱۱٥۲ | ۱/۹ |
| Terpinene-4-ol | ۱٦ | ۱۱۷۸ | ۳/۸ |
| Verbenone | ۱۷ | ۱۲٦۰ | ۱/۰ |
| Thymol | ۱۸ | ۱۲۹٦ | ۲۳/۳ |
| Carvacrol | ۱۹ | ۱۳۱۰ | ۲/٦ |
| Candinol | ۲۰ | ۱۳۳۸ | ۳/۹ |
| Hexadecanoeic acid | ۲۱ | ۱۳۷۰ | ۳/٤ |

**بحث**

طب سنتی از هزاران سال پیش جهت اهداف درمانی استفاده شده که در این میان استفاده از عصاره و اسانس¬های گیاهی جای گاه قابل ملاحظه ای پیدا کرده است. این ترکیبات به طور کلی بی-ضرر نامیده می¬شوند. مواد حاصل از اسانس و عصاره های گیاهان را می¬توان جهت حفظ و نگه داری مواد غذایی و هم چنین در داروسازی به عنوان عوامل درمانی جدید علیه بیماری¬ها و عفونت¬های میکروبی بکار برد. در حال حاضر ۵۰-۲۰ درصد از داروهای رایج با منشا گیاهی در دنیا مصرف می¬شوند. ازآن جایی که روز به روز بر تعداد باکتری¬های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک¬ افزوده می¬شود، جهت کنترل و از بین بردن عفونت¬های میکروبی مقاوم کشف عوامل درمانی جدید یک نیاز ضروری می¬باشد.

با توجه به بالاتر بودن درصد تیمول در بین ترکیبات دیگر گیاه زنیان می¬توان اثر میکروب کشی اسانس این گیاه را به این ترکیب نسبت داد. ترکیبات فنولی نقش بسیار مهمی در خواص آنتی میکروبیال ادویه ها و گیاهان معطر دارند. ترکیبات فنولی خواص ضدمیکروبی خود را با روش_های متفاوت اعمال می-کنند. اسانس¬ها با تاثیر در روی دیواره سلولی و پروتئین و تداخل در کار آنزیم¬های غشا باعث نابودی میکروارگانیسم ها می¬شوند. این ترکیبات نفوذپذیری غشا را افزایش می¬دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن غشا و فعالیت آن را تحت تاثیر قرار می¬دهند و در نهایت منجر به از بین رفتن سلول خواهند شد۱۵)

اسانس بذر زنیان بر باکتری گرم منفی اشرشیاکلی اثر کمتری نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشت و MIC اسانس برای باکتری¬های گرم منفی نسبت به باکتری¬های گرم مثبت بیش تر بود. نشان داده است که باکتری¬های گرم مثبت نسبت به اسانس¬ها حساس تر از باکتری¬های گرم منفی هستند(۱۶). به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری¬های گرم منفی این باکتری¬ها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس-ها حساسیت کم تری را از خود نشان دهند. این غشا خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می¬کند. در باکتری¬های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس¬ها با این فسفولپید دو لایه آبی صورت می¬گیرد. این ترکیبات اثرخود را را در این محل بر جای می¬گذارند. این اثر یا به صورت افزایش نفوذپذیری یون ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می¬دهد و یا این که به صورت ناتوانی سیستم آنزیم باکتریایی بروز می¬کند(۱۷).

**نتیجه گیری**

آزمایشات کلینیکی بر روی بیماران بعد از مصرف اسانس گیاه جهت تائید این موارد توصیه می¬شود تا در نهایت بتوان ازآن در رده داروهای گیاهی فرموله شده برای بیماران استفاده نمود.

**تشکر وقدردانی**

بدین وسیله از هم کاری کارکنان مرکز تحقیقات عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان خانم ناهید سپهری راد و بخصوص مسئول این مرکز خانم دکتر ملیحه متانت نهایت تقدیر و تشکر به عمل می آید.

## REFERENCES

1.Kotzé M, Eloff J N . Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). South AfricanJournal of Botany. 2002; 68: 62-67.

2- Kermanshah H, Hashemi-Kamangar S, Arami , Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M et al . In vitro evaluation of antibacterial activity of extract of Salvia officinalis and Carum copticum against cariogenic microorganisms. The Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDA), 2011; 23 (3) :155-161.

3- Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G.Antimicrobial andante oxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). Food Chemistry, 2004; 84: 519-525.

4-- Kordali, S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A , Yildirim A. Determination of thechemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisiasantonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005; 53: 9452-9458.

5. Najafi, Sh. (2011) Medicinal plants, marandiz press, Mashhad (in Persian).

6-- RaoT S R. Two promising Varieties of ajowan for Andhra Pradesh. Indian- cocoa- Arecanut and Spices Journa, 1986; 9 (4): 98.

7- Pae H O, Oh H, Yun Y G, Oh G S, Jang S I, Hwang K M, Kwon T O, Lee H S , Chung H T.Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. Pharmacoloolgy Toxcicology, 2002; 91: 40-48.

8- Ye Y N, Liu E S L, Li Y, So H L, Cho C C M, Sheng H P, Lee S S, Cho C H. Protective effect of polysaccharides-enriched fraction from Angelica sinensis on hepatic injury. Life Science, 2001; 69: 637-646.

9- Aberoomand Azar A, Mottaghian Puor Z, Sharifan A, Larijani K. Studies on the effect of extraction method on chemical composition and antimicrobial activity of *Carum copticum* essential oil. Food Technology and Nutrition, 2010; 7(2): 81-75

10-. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M B, Taghizadeh M, Alipoor Astaneh Sh, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum* and *Rosmarinus officinalis*. Journal of essential oils Food Chemistry, 2007; 102: 898-904.

11- Singh G, Kapoor I P S, Pandey S K, and Singh U K. water Studies on essential oils: Part10; Antibacterial activity of volatile oils from some species, Phytotherapy Research, 2005; 16: 680-682.

12- Rani P, Khullar N. Antimicrobialevaluation of some medicinal plants for their antientericpotential against Multi-drug resistant*Salmonella typhi*. Phytotheraphy Research, 2004; 18: 670.

13-Davazdah Emami s, Sefidkon f, Jahansooz M R, Mazaheri D. Evaluation of water salinity effects on yield and essential oil content and composition of *Carum copticum.* Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2010; 25(4):504-512 (In Persian).

14- Saeedi S, Sabbagh S, Sabori Robat E. A study of antibacterial activity of plant extract and essential oil of *Myrtus communis* against resistant strains of *Staphyloccocus aureus* bacteria to selective antibiotics , Journal of zabol university of medical sciences and health services, 2012; 4 (3) :21-32.

15- Celiktas O Y, Hames Kocabas E E, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser K H C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location And seasonal variation, Food Chemistry, 2007; 100: 553-559.

16- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in food- a review. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94: 223-253.94: 223-253.

17- Sandri I G, Zcaria J, Fracaro F, Delamare A p L, Echeverrigaray S. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Culina against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food chemistry, 2007;103-823-828.