

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola

Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* serovars from avian source

Janio Moraes Santurio^I Deise Flores Santurio^I Patrícia Pozzatti^{II} Cristiane Moraes^{III}
Paulo Rogério Franchin^{III} Sydney Hartz Alves^{I,II}

RESUMO

Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) frente a 60 amostras de *Salmonella enterica* distribuídas entre 20 sorovares, todos isolados de carcaças de aves. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para cada isolado, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. O óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana (CIM média = 529 µg ml⁻¹ e CBM média = 661 µg ml⁻¹), seguido do tomilho (CIM média = 961 µg ml⁻¹ e CBM média = 1074 µg ml⁻¹), com atividade moderada, enquanto que a menor atividade foi observada com o óleo essencial de canela (CIM média = 1335 µg ml⁻¹ e CBM média = 1979 µg ml⁻¹). Apesar deste claro padrão de atividade, os sorovares de *Salmonella enterica* evidenciaram significativas variações de suscetibilidade, embora nenhuma, em particular, pudesse ser classificada como totalmente sensível ou resistente aos três óleos essenciais avaliados. Assim, no momento em que os antibacterianos utilizados como promotores de crescimento estão sendo substituídos. E os óleos essenciais de temperos e condimentos se constituem numa alternativa importante, os resultados aqui apresentados sinalizam dois pontos: os óleos essenciais de orégano e tomilho são efetivos contra *Salmonella*, mas as variações de suscetibilidade entre os sorovares deverão também ser consideradas.

Palavras-chave: *Salmonella*, óleos essenciais, orégano, tomilho, canela, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Essential oils from oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) were tested for their inhibitory activity against sixty *Salmonella sp.* isolates. These microorganisms were distributed in 20 serovars, all of them isolated from broiler

chickens. Based on microdilution technique, the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined. The strongest antibacterial activity was obtained for oregano (MIC mean = 529 µg ml⁻¹ and MBC mean = 661 µg ml⁻¹), followed by a moderate activity for thyme (MIC mean = 961 µg ml⁻¹ and MBC mean = 1074 µg ml⁻¹) and the lowest obtained activity observed for cinnamon (MIC mean = 1335 µg ml⁻¹ and MBC mean = 1979 µg ml⁻¹). Despite of this activity pattern, the serovars of *Salmonella enterica* showed significant susceptibility variations. However none of them could be classified as sensitive or resistant to the three essential oils tested. At the moment, when the antibiotics, as growth promoters, are being replaced, the essential oils from spices could be a very reasonable choice and the present results show us two points: the essential oils from oregano and thyme are effective against *Salmonella* isolates but the variations among the serovars must be considered.

Key words: *Salmonella*, essential oils, oregano, thyme, cinnamon, antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias e se constitui em importante barreira ao comércio internacional de alimentos. A ampla distribuição de *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (BUTAYE et al., 2003). O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende as espécies *S. enterica* e *S. bongori*; a

^IDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: santurio@smail.ufsm.br. Autor para correspondência.

^{II}Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Perdigão Agroindustrial S.A. Videira, SC, Brasil.

espécie *S. enterica* alberga as linhagens patogênicas distribuídas em seis subespécies e 2.564 sorovares, todas patogênicas ao homem (BOPP et al., 2003). Em consequência da ampla distribuição bacteriana no intestino das aves, desde 1953, agentes antibacterianos têm sido incorporados na ração animal, devido ao benéfico e vantajoso efeito no desenvolvimento ponderal de aves e suínos. Esta prática consolidou-se e os antimicrobianos passaram a ser chamados de promotores de crescimento, porque reduzem a morbidade e a mortalidade causadas por doenças clínicas e subclínicas; também, incrementam a conversão alimentar, favorecendo o crescimento (BUTAYE et al., 2003). Desta forma, os antimicrobianos contribuíram para a expansão da avicultura e suinocultura, atingindo os patamares capazes de influenciar na balança comercial dos países produtores (MENTEN, 2001). Mais recentemente, entretanto, o amplo uso destes agentes tem sido alvo de restrições; na União Européia, a partir de 2006, será proibida a utilização de antibacterianos como promotores de crescimento na produção animal (BUTAYE et al., 2003; BRUGALI, 2003). Tais regulamentações têm forçado a busca de alternativas que garantam o máximo crescimento dos animais sem afetar a qualidade do produto final. As principais alternativas que têm sido pesquisadas incluem prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais (MILTEMBERG, 2000; JEAUROUND, 2002). A utilização de plantas como medicamentos acompanhou o processo civilizatório e ainda representa uma fonte de recursos à moderna farmacologia. A inclusão de extratos vegetais às rações animais requer ausência de toxicidade e assim os óleos essenciais de vegetais, tradicionalmente utilizados como condimentos ou temperos, enquadram-se a este fim, agora, com renovado interesse (BRUGALI, 2003).

Os óleos essenciais constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas (SIMÕES & SPITZER, 1999), cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, etc, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário. Assim, no orégano, temos o carvacrol (3 a 17%); no tomilho, o timol (40%) e, na canela, o cinamaldeído (75%) (FARMACOPEA ITALIANA, 1998). No âmbito do consumo de rações destinadas à Avicultura e Suinocultura, há nítida preocupação pela substituição dos antibacterianos, denominados promotores de crescimentos, por agentes não menos efetivos, mas de origem natural (MENTEN, 2001; MILTEMBERG, 2000). Os óleos essenciais extraídos de orégano, tomilho,

canela, entre outros, têm potencial antimicrobiano significativo (JEAUROUND et al., 2002; BURT, 2004; KALEMBA & KUNICKA, 2003); todavia, a maioria das publicações estabelece generalizações sobre estas atividades frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos, incluindo limitado número de representantes de cada espécie, sendo costumeira a utilização de apenas um exemplar catalogado como os da coleção ATCC (HAMMER et al., 1999; SMITH-PALMER et al., 1998).

Com esta perspectiva, é fundamental avaliar, à luz de técnicas microbiológicas modernas e padronizadas, a atividade de óleos essenciais sobre *Salmonella*, um dos principais patógenos dos intestinos de aves e suínos. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*), frente a 60 isolados de *Salmonella enterica*, compreendendo 20 sorovares, todos de origem avícola.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Foram utilizados 60 cultivos de *Salmonella enterica*, isolados de carcaça de aves, incluindo os sorovares: Anatum (3), Agona (5), Orion (3), Ohio (3), Enteritidis (7), Typhimurium (2), Pullorum (2), Senftenberg (4), Mbandaka (1), Livingstone (4), Panama (2), Rissen (4), Saintpaul (3), Schwarzengrund (3), Tennessee (1), Worthington (5), Heidelberg (2), Cerro (2), Derby (2) e Infantis (2).

Óleos essenciais

Foram utilizados os óleos essenciais de orégano, tomilho e canela, obtidos comercialmente em frascos âmbar, lacrados, com volumes de 5 ml (Essential7.com; Roewell, New Mexico, USA).

Determinação da atividade antibacteriana

Diluição dos óleos essenciais: após pesagem de 1g, cada óleo era diluído com metanol até atingir a concentração de 640mg ml⁻¹ (Solução I). A seguir, realizou-se a diluição 1:100 em Caldo Muller-Hinton, obtendo-se a concentração de 6400µg ml⁻¹ (Solução II).

Determinação da concentração inibitória mínima: com base no documento M7-A4 do NCCLS (NCCLS, 1997), consistiu na distribuição de 200µL de Caldo Muller-Hinton em poços de uma placa de microtitulação; a seguir, 200µL da Solução II eram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, transferia-se para o segundo e assim sucessivamente,

obtendo-se concentrações finais de : 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50, e 25 µg ml⁻¹. A preparação do inóculo consistiu em preparar, com colônias desenvolvidas no ágar Muller-Hinton, uma suspensão bacteriana em salina, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1 x 10⁸ UFC ml⁻¹). A seguir, diluíu-se esta suspensão 1:100 com caldo Muller-Hinton, obtendo-se como inóculo 1 x 10⁶ UFC ml⁻¹. Desta suspensão, inoculavam-se 10 µl (1 x 10⁴ UFC) em cada poço já contendo os óleos essenciais. As microplacas eram incubadas a 35°C/ 24h, em condições de aerobiose. A determinação das CIMs consistia em examinar a placa, registrando-se a menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento. A CIM 50% foi definida como a menor concentração capaz de inibir 50% dos isolados. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM): a partir dos poços onde não havia o desenvolvimento de crescimento bacteriano visível, retirava-se uma alíquota de 10 µl, semeando-a na superfície do ágar Muller-Hinton. Após 48h de incubação a 35°C, definia-se a concentração bactericida mínima como a menor concentração do óleo essencial

em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Interpretação

As CIMs entre 50-500 µg ml⁻¹ foram consideradas de elevada atividade; moderada atividade para as CIMs entre 600-1.500 µg ml⁻¹ e fraca atividade para as CIMs acima de 1.500 µg ml⁻¹ (SARTORATTO et al., 2004).

RESULTADOS

As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela, obtidas através de microdiluição em caldo, expressas como CIM, CIM 50% e CBM, estão dispostas nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Com base nas CIMs, a faixa de suscetibilidade de isolados representantes de vinte sorovares de *Salmonella enterica* ao orégano (Tabela 1) evidenciou variações de 200 µg/ml a 1.600 µg ml⁻¹, o que foi coincidente com a CIM 50%. Apesar desta larga variação, a média aritmética das CIMs foi de 510 µg ml⁻¹, ressaltando a forte atividade antimicrobiana deste óleo essencial. Os isolados mais sensíveis foram os

Tabela 1 – Suscetibilidade de sorovares de *Salmonella enterica* frente ao óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*).

Sorovares de <i>Salmonella enterica</i>	Atividade antimicrobiana				
	CIM (µg ml ⁻¹)			CBM (µg ml ⁻¹)	
	Faixa	Média	MIC50	Faixa	Média
Anatum (3)	400 – 800	666	800	400 – 800	666
Agona (5)	200 – 800	320	400	200 – 800	440
Cerro (2)	400 – 400	400	400	400 – 400	400
Derby (2)	1600 – 1600	1600	1600	1600 – 1600	1600
Enteritidis (7)	200 – 800	457	400	200-1600	628
Heidelberg (2)	400 – 400	400	400	400 – 400	400
Infantis (2)	400 – 400	400	400	400 – 400	400
Livingstone (4)	400 – 800	700	800	400 – 1600	900
Mbandaka (1)	800	800	800	1600	1600
Ohio (3)	200 – 800	400	200	400 – 800	533
Orion (3)	400 – 800	533	400	400 – 800	533
Panama (2)	800 – 800	800	800	1600 – 1600	1600
Pullorum (2)	200 – 400	300	200	400 – 400	400
Rissen (4)	200 – 400	350	400	200 – 400	350
Saintpaul (3)	200 – 800	466	400	200 – 800	466
Schwarzengrund (3)	400 – 400	400	400	400 – 400	400
Senftenberg (4)	200 – 200	200	200	200 200	200
Tennessee (1)	200	200	200	400	400
Typhimurium (2)	400 – 800	600	400	400 – 800	600
Worthington (5)	200 – 800	600	800	200 – 800	680
Média		529			661

CIM = Concentração inibitória mínima.

CBM = Concentração bactericida mínima.

Tabela 2 – Suscetibilidade de sorovares de *Salmonella enterica* frente ao óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*).

Sorovares de <i>Salmonella enterica</i>	Atividade antimicrobiana				
	CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			CBM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	Faixa	Média	MIC50	Faixa	Média
Anatum (3)	800 – 1600	1066	800	800 – 1600	1066
Agona (5)	400 – 1600	1040	800	800 – 1600	1120
Cerro (2)	800 – 800	800	800	800 – 800	800
Derby (2)	800 – 800	800	800	800 – 800	800
Enteritidis (7)	800 – 1600	1028	800	800 – 1600	1257
Heidelberg (2)	800 – 1600	1200	800	1600 – 1600	1600
Infantis (2)	800 – 800	800	800	800 – 800	800
Livingstone (4)	400 – 800	700	800	800 – 800	800
Mbandaka (1)	800	800	800	800	800
Ohio (3)	800 – 800	800	800	800 – 800	800
Orion (3)	400 – 1600	800	400	1600-1600	1600
Panama (2)	800 – 800	800	800	800 – 800	800
Pullorum (2)	800 – 1600	1200	800	800 – 1600	1200
Rissen (4)	800 – 1600	1200	800	800 – 1600	1200
Saintpaul (3)	800 – 800	800	800	800-800	800
Schwarzengrund (3)	800 – 1600	1066	800	800 – 1600	1333
Senftenberg (4)	1600 – 1600	1600	1600	1600 – 1600	1600
Tennessee (1)	800	800	800	800	800
Typhimurium (2)	800 – 1600	1200	800	800 – 1600	1200
Worthington (5)	400 – 800	720	800	800 – 1600	1120
Média		961			1074

CIM = Concentração inibitória mínima.

CBM = Concentração bactericida mínima.

representantes dos sorovares Senftenberg, Tennessee, Pullorum e Rissen. Por outro lado, os isolados menos sensíveis foram os representantes do sorovar Derby (CIM= $1.600\mu\text{g ml}^{-1}$). Em 17 sorovares, totalizando 47 (78,3%) isolados observou-se que a CBM foi coincidente com a CIM, o que também ressalta a elevada atividade bactericida do óleo essencial de orégano.

Frente ao óleo essencial extraído de tomilho, as CIMs das sorovares de *Salmonella enterica* (Tabela 2) variaram de 400 a $1.600\mu\text{g ml}^{-1}$, também coincidentes com a variação das CIMs 50%. A média das CIMs foi de $961\mu\text{g ml}^{-1}$, indicando que o óleo de tomilho tem moderada atividade sobre os isolados estudados. Isolados representantes de onze sorovares evidenciaram maior suscetibilidade, destacando-se: Livingstone, Worthington, Cerro, Derby, Mbandaka, Ohio, Orion, Panama, Saintpaul e Tennessee; por outro lado, os isolados representantes do sorovar Senftenberg, seguidos de Heidelberg, Pullorum, Rissen e Typhimurium, requereram as maiores concentrações de óleo de tomilho para serem inibidos. As concentrações bactericidas mínimas variaram de $800\mu\text{g ml}^{-1}$ (58,3%) a $1.600\mu\text{g ml}^{-1}$ (41,4%), com média de

$1.133\mu\text{g ml}^{-1}$; em 50 isolados (83,3%), as CIMs e CBMs foram coincidentes.

A atividade do óleo de canela sobre os sorovares de *Salmonella enterica* (Tabela 3) evidenciou suscetibilidade variável de 400 a $3.200\mu\text{g ml}^{-1}$ para CIM e de 800 a $3.200\mu\text{g ml}^{-1}$ para CBM. A média geral das CIMs foi de $1.335,3\mu\text{g ml}^{-1}$, indicando moderada atividade antibacteriana; já a média das CBMs foi de 1979, $6\mu\text{g ml}^{-1}$. Apesar da menor atividade antibacteriana deste óleo essencial, quatro isolados (sorovares Derby, Infantis e Typhimurium) foram fortemente inibidos por esta essência, evidenciando CIMs de $400\mu\text{g ml}^{-1}$. Os isolados menos suscetíveis às concentrações inibitórias do óleo de canela incluíram representantes dos sorovares Ohio e Schwarzengrund, enquanto Livingstone, Mbandaka, Ohio e Saintpaul requereram as maiores concentrações para serem mortos. Em 32 (53,3%) isolados, as CIMs, foram coincidentes com as CBMs.

DISCUSSÃO

A emergência de resistência de *Salmonella* às drogas antimicrobianas constitui-se numa dupla

Tabela 3 – Suscetibilidade de sorovares de *Salmonella enterica* frente ao óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

Sorovares de <i>Salmonella enterica</i>	Atividade antimicrobiana				
	CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)			CBM ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	Faixa	Média	MIC50	Faixa	Média
Anatum (3)	800 – 1600	1066	800	1600-1600	1600
Agona (5)	800 – 1600	1120	800	800 – 1600	1120
Cerro (2)	1600 – 1600	1600	1600	1600 – 1600	1600
Derby (2)	400 – 400	400	400	1600 – 1600	1600
Enteritidis (7)	800 – 1600	1028	800	800 – 1600	1257
Heidelberg (2)	800 – 1600	1200	800	1600 – 3200	2400
Infantis (2)	400 – 800	600	400	800 – 1600	1200
Livingstone (4)	1600 – 3200	2000	1600	3200 – 3200	3200
Mbandaka (1)	1600	1600	1600	3200	3200
Ohio (3)	1600 – 3200	2133	1600	3200 – 3200	3200
Orion (3)	800 – 1600	1066	800	1600 – 3200	2133
Panamá (2)	800 – 800	800	800	800 – 1600	1200
Pullorum (2)	800 – 1600	1200	800	800 – 1600	1200
Rissen (4)	1600 – 3200	2000	1600	1600 – 3200	2000
Saintpaul (3)	1600 – 1600	1600	1600	3200 – 3200	3200
Schwarzengrund (3)	1600 – 3200	2133	1600	1600 – 3200	2133
Senftenberg (4)	1600 – 1600	1600	1600	1600 – 3200	2000
Tennessee (1)	1600	1600	1600	1600	1600
Typhimurium (2)	400 – 1600	1000	400	800 – 3200	2000
Worthington (5)	800 – 1600	960	800	800 – 3200	1750
Média		1335			1979

CIM = Concentração inibitória mínima.

CBM = Concentração bactericida mínima.

ameaça ao homem e aos animais, sendo decorrente do intenso emprego de antimicrobianos em medicina humana e veterinária (VAN DUIJKEREN et al., 2003; BOPP et al., 2003). Um estudo realizado na Holanda (VAN DUIJKEREN et al., 2003) comparou a suscetibilidade de sorovares de *Salmonella* isolados entre 1984-1989 com isolados do período entre 1996-2001; a multirresistência em isolados humanos variou de 3,2% para 45%; em suínos, a variação foi de 3,9% para 41,7% e, nas aves, de 1,8 para 25,2%; o sorovar Typhimurium foi o que evidenciou os maiores percentuais de resistência. No Brasil, os sorovares Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Agona e Heidelberg são bastante presentes e com elevados percentuais de resistência (WEISS et al., 2002). Numa interpretação genérica, com base nas médias das CIMs e nas CIMs 50%, o presente estudo evidenciou que a atividade do óleo de orégano foi superior ao do tomilho, e este superior ao de canela. Resultados semelhantes foram observados por NOSTRO et al., (2004), ao avaliarem a suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA). HELANDER et al. (1998), ao caracterizarem a atividade dos componentes dos óleos

essenciais, observaram que o carvacrol e o timol, principais frações do orégano e do tomilho, respectivamente, evidenciaram atividades similares, as quais eram superiores a do cinamaldeído, principal constituinte do óleo de canela. SARTORATTO et al. (2004), no Brasil, observaram CIMs das essências de orégano e tomilho sobre *Salmonella choleraesuis* similares às obtidas no presente estudo.

Os resultados aqui obtidos indicam também certo grau de especificidade entre os óleos essenciais e os isolados incluídos no estudo, representando os sorovares. Por outro lado, a falta de uniformidade entre o número de isolados representantes de cada sorovar impede de se estabelecer as variações das CIMs como características dos respectivos sorovares. Entretanto, ficou claro que os isolados representantes do sorovar Derby foram menos sensíveis ao orégano, mas bastante sensíveis aos óleos de tomilho e canela, enquanto o isolado representante do sorovar Mbandaka foi pouco sensível aos óleos de orégano e canela, mas, nitidamente, sensível ao óleo de tomilho.

Com relação às concentrações bactericidas mínimas (CBM), a suscetibilidade dos sorovares

estudados seguiu o mesmo padrão observado nas CIMs. Todavia, a literatura não dispõe de estudos que classifiquem a atividade bactericida de óleos essenciais, o que limita a , tão somente, apresentar-se estes dados. É, ainda, oportuno salientar que CBM implica a morte bacteriana, e o óleo essencial de orégano, em concentrações abaixo de 500µg ml⁻¹, foi efetivo nesta ação sobre dez (50%) dos sorovares estudados, compreendendo 28 (46,6%) isolados. Já os óleos essenciais de tomilho e canela não evidenciaram o mesmo desempenho.

As comparações de nossos resultados com estudos similares deve ser cautelosa, na medida em que a grande maioria dos estudos emprega a técnica de difusão em ágar, fornecendo resultados referentes ao diâmetro de inibição, expressos em milímetros; mesmo os estudos de microdiluição em caldo, na grande maioria dos casos, não seguem procedimentos padronizados, como os aqui empregados. A autobiografia é outra técnica de avaliação da atividade antimicrobiana que combina cromatografia em camada delgada com difusão em ágar e cujos resultados referem-se aos diâmetros dos halos de inibição e não às CIMs.

Finalmente, este estudo permitiu evidenciar a nítida especificidade da atividade de alguns óleos essenciais sobre determinadas sorovares, indicando que a substituição dos promotores de crescimento nas rações para aves ou suínos deverá levar em consideração tal fato, não podendo, por isso, embasar-se na eleição de apenas uma essência. Estudos adicionais abordando o sinergismo entre óleos essenciais são fundamentais para o rápido desenvolvimento desta questão, de significativo impacto na Avicultura e Suinocultura brasileiras.

REFERÊNCIAS

- BOPP, C.A. et al. *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM, 2003. Cap.28, p.459–474.
- BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: CBNA, 2003. V.1, p.167-182.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.
- BUTAYE, P. et al. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.2, p.175-188, 2003.
- FARMACOPEA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA. X Edizione. Roma: Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato, 1998. V.I, p.206-210.
- HAMMER, K.A. et al. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.
- HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.
- JEAUROUND, E. et al. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v.20, suppl.1, p.394, 2002.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813-829, 2003.
- MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na produção de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2001, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p.141-157.
- MILTEMBERG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: IAC, 2000. p.87-100.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A4. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997. 32p.
- NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicilin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol, and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol**, v.35, p.275-280, 2004.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Cap.18, p.387-416.
- SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.
- VAN DUJIKEREN, E. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3574–3578, 2003.
- WEISS, L.H.N. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.3, p.104-108, 2002.