

Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos

Paula F.C. Nascimento¹, Analuiza C. Nascimento¹, Carolina S. Rodrigues¹,
Ângelo R. Antonioli², Patrícia O. Santos³, Antônio Márcio Barbosa Júnior³,
Rita C. Trindade^{3*}

¹Departamento de Odontologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe,
49060-100, Aracaju, SE, Brasil,

²Departamento de Fisiologia, Laboratório de Farmacologia, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000,
São Cristóvão, SE, Brasil,

³Departamento de Morfologia, Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal de Sergipe,
49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil

RESUMO: Os dados obtidos na literatura sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais são tratados do ponto de vista experimental, considerando-se uma possível aplicação clínica dos óleos. O presente estudo teve como objetivo analisar os fatores que influenciam na atividade antimicrobiana de óleos essenciais, *in vitro*, com base nos resultados descritos na literatura. Foi verificado que os testes e avaliações da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais podem ser dificultados pela volatilidade do óleo, sua insolubilidade em água e sua complexidade química. Tais dificuldades tornam os resultados disponíveis na literatura, difíceis de comparar. Por outro lado, os métodos usados diferem largamente e fatores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados. Assim, após breve levantamento, concluiu-se que alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como: a técnica usada, o meio de cultura, densidade do inóculo, o óleo essencial e o emulsificador utilizado. Portanto, para a realização de testes que visam verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, é necessário definir e adotar uma metodologia adequada e bem padronizada.

Unitermos: Óleo essencial, atividade antimicrobiana, métodos.

ABSTRACT: "Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods". The given data of the literature on the antimicrobial activity of the essential oils are treated from the experimental point of view, and they consider a possible clinical application of the oils. The purpose of this study is to analyze the factors that can influence on antimicrobial activity of essential oils, *in vitro*, based on preview data from literature. We noticed that the tests and evaluations of the antimicrobial activity of the essential oils can be hindered by the volatility of the oil, its insolubility in water and its chemistry complexity. These details make the results obtained on literature difficult to compare. The used methods differ broadly and important factors that influence the results are frequently neglectful. After a bibliographical rising, we concluded that a large attention should be given to some factors when we work with essential oils: the used technique, the growth medium, the inoculums density, the tested essential oil and the used emulsifying. It's necessary to define and follow a right and standard methodology to make antimicrobial activity testes of essential oils.

Keywords: Essential oil, antimicrobial activity, methods.

INTRODUÇÃO

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Almeida et al., 2006; Arruda et al., 2006; Nunes et al 2006; Benkeblia, 2004; Rehder et al., 2004; Claffey, 2003; Seymour, 2003;

Arweiler et al., 2000; Fine et al., 2000; Pan et al., 2000).

Para tanto, tem se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura,

o(s) microrganismo(s) e o óleo essencial testados. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar os fatores que influenciam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, *in vitro*, com base nos resultados descritos na literatura.

Testes de susceptibilidade *in vitro*

O ressurgimento do interesse nas terapias naturais e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros requerem mais dados sobre os óleos e extratos de plantas (De-Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2006a; Oliveira et al., 2006b; Lis-Bachin; Deans, 1997;). Vários estudos têm apontado algumas propriedades terapêuticas dos óleos, destacando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e antiinflamatória (Oyedji; Afolayan, 2006; Lima et al., 2006; Costa et al., 2005; Halcon; Milkus, 2004).

Nos ensaios sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro* é possível verificar uma variedade de metodologias propostas, o que torna a comparação entre esses estudos problemática (Hammer et al., 1999).

Os métodos comumente usados são o de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima - CIM (Nostro et al., 2004; Cimanga et al., 2002; Shafi et al., 2002; Canillac; Mourey, 2001; Takaisi-Kikuni et al., 2000). Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de microrganismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador (Opalchenova; Obreshkova, 2003; Hood et al., 2003; Lambert et al., 2001; Hammer et al., 1999).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido às propriedades químicas que estes apresentam. Dessa forma, feitas modificações esses métodos podem ser usados em algumas situações. Na maioria dos estudos, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com aquelas obtidas pelos antibióticos, no entanto, é importante destacar que esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos, bem como, outras variáveis (técnica usada, o meio de crescimento, o microrganismo teste) devem ser levadas em consideração (Duarte et al., 2005; Nostro et al., 2004; Saeed; Sabir, 2004; Christophe t al., 2000).

As substâncias normalmente testadas pelos

métodos propostos pelo NCCLS têm natureza hidrófila e os testes são padronizados para esta condição. Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Além disso, podem formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados, sendo assim, a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido um dos empecilhos encontrados para a realização desse tipo de estudo (Hood et al., 2003).

Outro problema observado é quando se utiliza a técnica de difusão em ágar, pois a difusão irregular dos componentes lipófilos dos óleos resulta em concentrações desiguais do óleo no ágar causando a formação de regiões com atividade antimicrobiana variável e, finalmente, a determinação de um número de bactérias viáveis remanescentes, após a adição do óleo. Desta forma, acredita-se que os métodos disponíveis não favorecem a padronização e a conseqüente reprodução de resultados que efetivamente expressem a realidade, sendo, por isso, incapazes de comparar diretamente a verdadeira atividade dos óleos (Setzer et al., 2004; Sokmen et al., 2004; Hood et al., 2003).

Visando melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificadores, a exemplo de Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetil sulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos através do meio de cultura (Groppo et al., 2002; Baydar et al., 2004; Bruni et al., 2004). As propriedades físicas e químicas desses agentes são importantes para auxiliar na visualização da atividade antimicrobiana dos óleos, no entanto, deve-se levar em consideração que ao se introduzir um agente emulsificador, este está sujeito a possíveis interações com a substância em teste, bem como, possuir atividade antimicrobiana. Esses efeitos podem ser acentuados ou minimizados a depender do modo de preparo da solução óleo-agente emulsificador. Por isso, preconiza-se uma relação adequada entre óleo e emulsificador (Hammer et al., 1999; Janssen et al., 1987).

A interferência do agente emulsificador na susceptibilidade da bactéria ao óleo essencial pode ser explicada pela possível influência que este exerce sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular. Os emulsificadores podem agir antagonica ou sinergicamente aos componentes ativos do óleo. Altas concentrações de Tween, por exemplo, podem aumentar a atividade antibacteriana produzindo resultados falso-positivos ou reduzir a bio-atividade do óleo, esse último efeito é, possivelmente, causado pela formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os microrganismos (Takarada et al., 2004; Cox et al., 2000). Para minimizar esses efeitos, alguns autores propuseram que os emulsificadores Tween 20, Tween 80 e outros, sejam utilizados em concentrações que variem

entre 0.5 a 20% em solução com óleo. Para o Tween 80 especificamente, preconiza-se a concentração específica de 0,02% a fim de padronizar o método de diluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima - CIM, estando os valores desta relacionados ao agente emulsificador usado (Hood et al., 2003).

Outros fatores podem interferir nos valores da CIM obtidos através de métodos de difusão e diluição: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água (Rios; Recio, 2005; Hammer et al., 1999).

Existe um interesse em aumentar o conhecimento sobre as concentrações inibitórias dos óleos essenciais, em busca do equilíbrio entre a aceitabilidade e a eficácia da ação antimicrobiana. A CIM pode ser definida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos disponíveis podem ser divididos em grupos: difusão, diluição, impedância e densidade ótica (Tassou et al., 2000). Desses, a diluição mostrou ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos, enquanto a difusão em placa de Petri se constitui em um método qualitativo, por isso, esses métodos (diluição e difusão) não são necessariamente comparáveis. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes.

Na técnica de difusão em disco e em ágar a vantagem é limitada à geração de dados preliminares fornecendo, somente, dados qualitativos, devido a natureza hidrófoba da maioria dos óleos essenciais de plantas, uma vez que essa característica impede a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar (Lambert et al., 2001).

Variação dos microrganismos e óleos essenciais testados

Estudos da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, em sua maioria, não fornecem detalhes sobre a quantidade, o tipo de microrganismo utilizado e o espectro desta atividade, dificultando sua reprodutibilidade e a comparação dos dados. Além disso, a escolha dos microrganismos testados apresenta uma tendência de se utilizar linhagens de diferentes gêneros, o que resulta em uma variação significativa entre o diâmetro dos halos de inibição, tornando difícil a comparação. Por isso, sugere-se que o teste da ação antimicrobiana dos óleos essenciais seja realizado com isolados múltiplos para cada espécie testada (Hammer et al., 2003; Chang et al., 2001; Karaman et al., 2001; Hammer et al., 1999).

Outro fator importante a ser considerado na validação do efeito antimicrobiano do óleo é o conhecimento das particularidades de cada microrganismo, bem como do óleo a ser analisado. Em experimentos com fungos, por exemplo, deve-se levar em conta o tempo de incubação, uma vez que este acontece

em torno de dois a quinze dias, o que pode interferir no diâmetro do halo de inibição de alguns óleos, devido à decomposição ou evaporação destes durante o período de teste (Malele et al, 2003; Basim; Basim, 2003; Janssen et al., 1987).

Em relação às particularidades do óleo, algumas pesquisas a respeito de sua composição mostram que mesmo variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo. Ademais, outros fatores, como clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, fonte botânica, tratos culturais e colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) afetam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na atividade antimicrobiana (Sefidkon et al., 2007; Apel et al., 2006; Asekun et al., 2006; Carvalho-Filho et al., 2006; Oliveira et al., 2005; Potzernheim et al., 2006; Telci et al., 2006; Franco et al., 2005; Viljoen et al., 2005; Bassole et al., 2003; Opalchenova; Obreshkova, 2003; Azevedo et al., 2002; Rasooli; Mirmostafa, 2002; Lambert et al., 2001).

Vários estudos têm confirmado a influência dos fatores supracitados como determinantes na ação antimicrobiana dos óleos essenciais, a exemplo de Celiktas et al. (2007) que relacionou o aumento da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em amostras coletadas na primavera; Moon et al. (2006), verificaram variação significativa no tamanho dos halos de inibição quando testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes amostras de *Lavandula angustifolia* frente aos mesmos microrganismos.

A atividade antimicrobiana de um mesmo óleo pode ser, às vezes, bem diferente. Para uma espécie em particular, por exemplo, os valores de CIM determinados para óleos essenciais de quimiotipos de *Thymus vulgaris* diferem quando se usam outras linhagens de um mesmo microrganismo (Janssen et al., 1987). Tavares et al. (2005) analisou a composição do óleo essencial de três quimiotipos de *Lippia alba* e encontrou variação qualitativa e quantitativa entre os constituintes químicos.

O volume e a concentração dos óleos são parâmetros que também devem ser observados na avaliação do efeito antimicrobiano, pois podem afetar os resultados do sistema-teste. Por isso, nos estudos em que se utilizam cavidades no meio de cultivo, é necessário que estas contenham um volume mínimo de óleo que possibilite a visualização da inibição. Existe ainda um volume ótimo, a partir do qual não se observa um aumento do diâmetro do halo de inibição. Entretanto, a significância destes volumes na descrição da atividade antimicrobiana de um óleo essencial não é conhecida. Quando cilindros e discos de diâmetros similares são usados para o mesmo óleo, diâmetros de inibição iguais são encontrados. Isto é relevante porque a aplicação de

volumes difere largamente (Janssen et al., 1987).

CONCLUSÃO

Existem vários métodos descritos na literatura, propostos para mensurar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entretanto, as pesquisas sobre essa atividade têm sido dificultadas pela ausência de métodos padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos além de inviabilizar sua reprodutibilidade. Os métodos diferem largamente e fatores importantes que influenciam os resultados são frequentemente negligenciados. Importa, portanto, mencionar o número da linhagem do microrganismo testado, o tempo de exposição do microrganismo ao óleo, a utilização de controles positivos e negativos, o uso e a quantidade de emulsificador, a composição do óleo e a descrição precisa das condições em que foi obtido. Sem padronização é praticamente impossível elucidar a verdadeira bioatividade, o potencial terapêutico e a utilidade clínica dos óleos essenciais, bem como fazer uma comparação direta entre eles.

REFERÊNCIAS

- Almeida JRGA, Silva-Filho RN, Nunes XP, Dias CS, Pereira FO, Lima EO 2006. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. *Rev Bras Farmacogn 16(Supl.)*: 638-641.
- Apel MA, Sobral M, Henriques AT 2006. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Rev Bras Farmacogn 16*: 402-407.
- Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR, Lima EO, Sousa DP, Nunes XP, Pereira MSV, Barbosa-Filho JM, Cunha EVL 2006. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Rev Bras Farmacogn 16*: 307-311.
- Arweiler NB, Donos N, Netuschil L, Reich E, Sculean A 2000. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil - a pilot study. *Clin Oral Investig 4*: 70-73.
- Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ 2006. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis*. *Food Chem 101*: 995-998.
- Azevedo NR, Campos IFP, Ferreira HD, Portes TA, Santos SC, Seraphin JC, Paula JR, Ferri PH 2002. Essential oil chemotypes in *Hyptis suaveolens* from Brazilian Cerrado. *Biochem Syst Ecol 30*: 205-216.
- Basim E, Basim H 2003. Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. *Fitoterapia 74*: 394-396.
- Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore AS 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry 62*: 209-212.
- Baydar H, Sađdiç O, Özkan G, Karadođan T 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control 15*: 169-172.
- Benkeblia N 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm-Wiss Technol 37*: 263-268.
- Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, Romagnoli C, Sacchetti G 2004. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. *Food Chem 85*: 415-421.
- Canillac N, Mourey A 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol 18*: 261-268.
- Carvalho-Filho JLS, Blank AF, Alves PB, Ehlert PAD, Melo AS, Cavalcanti SCH, Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R 2006. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Rev Bras Farmacogn 16*: 24-30.
- Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem 100*: 553-559.
- Chang S-T, Chen P-F, Chang S-C 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol 77*: 123-127.
- Christoph F, Kaulfers P-M, Stahl-Biskup E 2000. A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of β -triketones. *Planta Med 66*: 556-560.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol 79*: 213-220.
- Claffey N 2003. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *J Clin Periodontol 30*: 22-24.
- Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev Bras Farmacogn 15*: 304-309.
- Cox SD, Mann CM, Marham JL 2000. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol 88*: 170-175.
- De-Souza MM, Garbeloto M, Denez K, Eger-Mangrich I 2006. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. *Rev Bras Farmacogn 16*: 365-371.
- Duarte MCT, Figueira, GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C 2005. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol 97*: 305-311.
- Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, Vincent JW 2000. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol 27*: 157-161.
- Franco J, Nakashima T, Franco L, Boller C 2005. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo

- essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. *Rev Bras Farmacogn* 15: 191-194.
- Groppo FC, Ramacciato JC, Simões RP, Flório FM, Sartoratto A 2002. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorexidine against oral microorganisms. *Int Dent J* 52: 433-437.
- Halcon L, Milkus K 2004. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control* 32: 402-408.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV 1999. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. *J Appl Microbiol* 86: 985-990.
- Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV 2003. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 18: 389-392.
- Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *J Essent Oil Res* 15: 428-433.
- Janssen AM, Scheffer JJC, Baerheim-Svendsen A 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Med* 53: 395-398.
- Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J Ethnopharmacol* 76: 183-186.
- Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91: 453-462.
- Lima, IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* 16: 197-201.
- Lis-Bachin M, Deans SG 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 82: 759-762.
- Malele RS, Mutayabarwa CK, Mwangi JW, Thoithi GN, Lopez AG, Lucini EI, Zygadlo JA 2003. Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzânia: Composition and antifungal activity. *J Essent Oil Res* 15: 438-440.
- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HMA 2006. Antibacterial activity of essential oils, hidrosols an plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. *Int J Aromatherapy* 16: 9-14.
- Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V 2004. Susceptibility of methicillin-resistant *staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett* 230: 191-195.
- Nunes XP, Maia GLA, Almeida JRGS, Pereira FO, Lima EO 2006. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Rev Bras Farmacogn* 16(Supl.): 642-644.
- Oliveira RN, Dias IJM, Câmara CAG 2005. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. *Rev Bras Farmacogn* 15: 39-43.
- Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima, IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2006a. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 16: 77-82.
- Oliveira FP, Lima EO, Siqueira Júnior JP, Souza EL, Santos BHC, Barreto HM 2006b. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Rev Bras Farmacogn* 16: 510-516.
- Opalchenova G, Obreshkova D 2003. Comparative studies on the activity of basil - an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *J Microbiol Methods* 54: 105-110.
- Oyedji OA, Afolayan AJ 2006. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. *J Essent Oil Res* 18: 57-59 (Sp. Iss. SI 2006).
- Pan P, Barnett ML, Coelho J, Brogdon C, Finnegan MB 2000. Determination of the *in situ* bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *J Clin Periodontol* 27: 256-261.
- Potzernheim MCL, Bizzo HR, Vieira RF 2006. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Rev Bras Farmacogn* 16: 246-251.
- Rasooli I, Mirmostafa SA 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oil. *Fitoterapia* 73: 244-250.
- Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT 2004. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applieri* e *Origanum vulgare*. *Rev Bras Pl Med* 6: 67-71.
- Ríos JL, Recio MC 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80-84.
- Saeed MA, Sabir AW 2004. Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*. *Fitoterapia* 75: 204-208.
- Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S 2007. The effect of distillation methods on stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chem* 100: 1054-1058.
- Setzer WN, Vogler B, Schmidt JM, Leahy JG, Rives R 2004. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. *Fitoterapia* 75: 192-200.
- Seymour R 2003. Additional properties and uses of essential oils. *J Clin Periodontol* 30: 19-21.
- Shafi PM, Rosamma MK, Jamil K, Reddy PS 2002. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oil. *Fitoterapia* 73: 414-416.
- Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Sahin F 2004. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 15(8): 627-634.
- Takaisi-Kikuni NB, Tshilanda D, Babady B 2000. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. *Fitoterapia* 71: 69-71.
- Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T 2004. A comparison of the antibacterial

- efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 19: 61-64.
- Tassou CC, Koutsoumanis K, Nychas GJE 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International* 33: 273-280.
- Tavares E.S, Julião LS, Lopes D, Bizzo HR, Lage CLS, Leitão SG 2005. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Rev Bras Farmacogn* 15: 1-5.
- Telci I, Bayram E, Yilmaz G, Avci B 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochem Syst Ecol.* 34: 489-497.
- Viljoen A M, Subramoney S, Vuuren S F V, Baser K H C, Demirci B 2005. The composition geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *J Ethnopharmacol* 96: 271-277.