

Interferência de óleos essenciais sobre antibióticos utilizados no tratamento de infecções da cavidade oral

Interference of essential oils on antibiotics used in the treatment of infections of the oral cavity

Lívia Araújo Alves¹

Irlan de Almeida Freires¹

Vanessa de Carvalho Jovito²

Leopoldina de Fátima Dantas Almeida³

Ricardo Dias de Castro⁴

RESUMO

Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de antibióticos (AB) amoxicilina, azitromicina e eritromicina associados aos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. - Eucalipto (OE1), *Eugenia uniflora* L. - Pitangueira (OE2) e *Mentha piperita* - Hortelã-Pimenta (OE3) sobre bactérias envolvidas com infecções da cavidade oral. Os ensaios microbiológicos, utilizados para determinar a interferência dos óleos essenciais sobre os antibióticos, foram realizados a partir da utilização da técnica de difusão em meio agar, que foi semeado com as cepas bacterianas: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus mitis* (ATCC 903). Foi avaliada a formação de halos de inibição de crescimento microbiano promovida por discos de papel de filtro impregnados com amoxicilina - AB1 (10 µg/mL), azitromicina - AB2 (15 µg/mL) e eritromicina - AB3 (15 µg/mL) isoladamente e associados às emulsões dos óleos essenciais na concentração de 320 µL/mL. Considerou-se efeito sinérgico na presença de halo de inibição de crescimento bacteriano $\geq$ a 2 mm quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do AB isoladamente, e antagônico quando inferior e indiferente quando do mesmo diâmetro, sempre comparado em relação ao halo do antibiótico isoladamente. Observou-se antagonismo, quando AB1 foi associado aos óleos e sinergismo quando associados a AB2 e AB3, com exceção do OE1, que exerceu efeito antagônico sobre AB3 em *S. mutans* e efeito indiferente sobre AB2 em *S. mitis*. Os óleos essenciais avaliados interferem na ação dos antibióticos, seja de forma antagônica ou sinérgica, sugerindo a realização de mais estudos acerca da possível combinação.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos Voláteis; Agentes Antibacterianos; Sinergismo Farmacológico

ABSTRACT

To evaluate the *in vitro* antibacterial activity of antibiotics (AB) amoxicillin, azithromycin and erythromycin associated with essential oils from *Eucalyptus globules* L. - Eucalyptus (OE1), *Eugenia uniflora* L. - Pitangueira (OE2) and *Mentha piperita* - Peppermint (OE3) on bacteria involved in oral infections. The microbiological trials were carried out by using the technique of diffusion in agar medium. The medium was seeded with bacterial strains: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus mitis* (ATCC 903). It was evaluated the formation of halos of microbial growth inhibition promoted by filter paper disks impregnated with amoxicillin - AB1 (10 µg/mL), azithromycin - AB2 (15 µg/mL) and erythromycin - AB3 (15 µg/mL) isolated and associated with the emulsions of essential oils at a concentration of 320 µL/mL. It was considered synergistic effect in the presence of zone of bacterial growth inhibition $\geq$ 2 mm, when compared with the inhibition zone formed by the action of AB isolated; antagonistic effect was determined when the zone was less than 2 mm and indifferent effect when was verified the same diameter, always compared with the inhibition zone formed by the action of AB isolated. There was antagonism when AB1 was associated with the oils and there was synergism when the oils were associated with AB2 and AB3, excepting OE1, which had antagonistic effect on AB3 against *S. mutans* and indifferent effect on AB2 against *S. mitis*. The essential oils evaluated interfere with the action of antibiotics antagonistically or synergistically, suggesting further studies on the possible combination.

KEYWORDS: Volatile Oils; Anti-Bacterial Agents; Drug Synergism

1 - Alunos de iniciação científica do curso de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, João Pessoa, Brasil.

2 - Cirurgião-dentista pela Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

3 - Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (mestrado) da UFPB, João Pessoa, Brasil

4 - Professor Assistente do Departamento de Clínica e Odontologia Social da UFPB, Doutorando do Programa de Pós-Graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB, João Pessoa, Brasil

Correspondência:

Lívia Araújo Alves:

Av. Tertuliano de Castro, 620, Bessa, 58035-170, João Pessoa, PB, Brasil.

Telefone: (83) 9934-3404.

E-mail:

(liviaalves_odonto@yahoo.com.br).

INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse no uso de plantas medicinais como fonte de agentes

combatentes de doenças consequentes da ação microbiana. Para tanto, estudos experimentais são essenciais para confirmar as possíveis propriedades antibióticas de um

grande número destas plantas e de seus produtos derivados¹.

Dentre os constituintes das plantas medicinais, os seus componentes essenciais bioativos ou óleos voláteis, também conhecidos como óleos essenciais, apresentam-se promissores na terapêutica de doenças infecciosas². Tais substâncias, geralmente, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos³. A abrangência da utilização de óleos essenciais é vasta e engloba fins variados, incluindo cuidados em relação à saúde bucal. Diversos estudos mostram a ação antibacteriana exercida por vários óleos essenciais ensaiados sobre cepas bacterianas^{4,5,6}.

A crescente procura de novos agentes antimicrobianos levou a investigações para o efeito antimicrobiano de fitoconstituintes extraídos de uma série de plantas, muita das quais foram utilizadas tradicionalmente por muitos anos⁷. Tal procura vem sendo impulsionada, principalmente, devido ao aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrente, sobretudo, do uso indiscriminado dos quimioterápicos, evidenciando, dessa forma, a necessidade de introdução de novos compostos bioativos no arsenal terapêutico com efeito antimicrobiano⁸.

Diante dessa perspectiva, alguns estudos^{6-9,10} propõem a associação de antibióticos sintéticos com produtos naturais, incluindo os óleos essenciais, na tentativa de ampliar seu espectro de ação e minimizar os efeitos indesejáveis, já que tal associação possibilita uma diminuição na quantidade (dose) da droga administrada^{11,12}.

Dessa forma, este estudo objetivou verificar a interferência dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto), *Eugenia uniflora* L. (pitanga), e *Mentha piperita* (menta) associados a antibióticos comumente utilizados para tratamento de infecções orais de origem odontogênica ou não, como amoxicilina, azitromicina e eritromicina, a fim de obter os efeitos positivos dessa associação e, por conseguinte, a formulação de novos agentes terapêuticos com concentrações menores dos antibióticos.

MÉTODOS

Óleos Essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita* foram obtidos na Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), e atendem todas as especificações exigidas concernentes ao seu controle de qualidade conforme laudo técnico disponibilizado pelo fornecedor (Quadro 1).

Óleo essencial	Lote	Princípio Ativo	Propriedades
<i>Eucalyptus globulus</i> L.	nº 144	Cineol	antiséptico, antisséptico, antimicrobiana, pulmonar, desinfetante, expectorante e sudorífera, tônico geral
<i>Eugenia uniflora</i> L.	nº 248	Linalol	adstringente, analgésica, antimicrobiana, depurativa, digestiva, estimulante, refrescante, refrigerante e vermífuga
<i>Mentha piperita</i>	nº 167	mentol, mentona e cineol	antiespasmódica, antiinflamatória, antimicrobiana, antiúlcera e antiviral

QUADRO 1: Caracterização dos óleos essenciais utilizados no estudo.

Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus mitis* (ATCC 903). As suspensões das cepas testes foram preparadas em BHI caldo - Brain Heart Infusion (DIFCO®, São Paulo, SP, Brasil), as quais foram padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia - (UFC/mL). Os microrganismos utilizados no estudo foram disponibilizados pelo Laboratório de Microbiologia Oral, localizado no Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil.

Antibióticos

Amoxicilina (10 µg/mL), azitromicina (15 µg/mL) e eritromicina (15 µg /mL) foram selecionados para inclusão no estudo tomando como base sua ampla utilização

para tratamento de infecções da cavidade bucal. O estudo de observação de sensibilidade das cepas bacterianas frente aos antibióticos foi realizado através da técnica de difusão em agar, utilizando discos de papel de filtro (*Sensibiodisc-CECON*®), segundo metodologia descrita por Bauer¹³.

Preparação das soluções dos óleos essenciais

As soluções dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita* foram obtidas seguindo metodologia descrita por Gayoso et al.¹⁴, onde em tubo de ensaio esterilizado foi adicionado 1,6 mL do óleo essencial, 0,04 de TWEEN 80 e q.s.p. 5 mL de água destilada estéril, sendo tal mistura agitada por cinco minutos utilizando aparelho Vortex. Este procedimento proporcionou a preparação de emulsões dos óleos essenciais com concentração de 320 µL/mL.

Estudo da interferência dos óleos essenciais sobre o efeito de antibióticos

Os discos contendo os antibióticos nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 20 µL da concentração de 320 µL/mL do óleo essencial, sendo em seguida colocados em placas de Petri estéreis (J.Prolab®) contendo agar sangue (Tryptic Soy acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado), inoculado com 1 mL das suspensões bacterianas, pelo método da inundação. Após incubação das placas a 37° C por 24 horas em microaerofilia, foi determinada a dimensão do halo de inibição de crescimento bacteriano dos óleos essenciais associados aos antibióticos frente as cepas bacterianas ensaiadas.

O uso do meio de cultura agar sangue reside na verificação da sua capacidade hemolítica presente da base nutritiva, particularmente importante na escolha dos testes complementares e diferenciais do gênero *Streptococcus*¹⁵.

Cleeland e Squires¹⁶ consideram como efeito sinérgico a ocorrência de halo de inibição do crescimento microbiano formado pela aplicação combinada do óleo essencial (OE) mais o antibiótico (AB) com diâmetro ≥ que 2 mm, quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do AB isoladamente. Quando da formação de halo de inibição decorrente da ação combinada AB e OE de menor diâmetro daquele desenvolvido pela ação isolada do AB

considerou-se efeito antagônico e como efeito indiferente quando da observação de halo de inibição conseqüente à aplicação combinada AB e OE com diâmetro igual àquele conseqüente da aplicação isolada do AB.

Para análise estatística descritiva dos dados, utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0. O ensaio foi realizado em duplicata.

RESULTADOS

Os resultados da ação dos antibióticos sobre as cepas bacterianas em estudo são mostrados na Tabela 1. Foi observado que os microrganismos *S. mutans* e *S. mitis* apresentaram-se sensíveis a amoxicilina – AB1 (10 µg/mL), com halos de inibição de crescimento bacteriano de 46,5 mm e 41,5 para *S. mutans* e *S. mitis*, respectivamente. Quanto a azitromicina (AB2), também foi verificada sensibilidade das bactérias ensaiadas, sendo encontrados halos de inibição de crescimento de, respectivamente, 21,5 mm e 21 mm para *S. mutans* e *S. mitis*. AB3 apresentou halos de 29 mm e 22 mm para *S. mutans* e *S. mitis*, nessa ordem.

Tabela 1: Diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano dos antibióticos Amoxicilina, Eritromicina e Azitromicina, utilizados isoladamente, frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* (resultados expressos em milímetros).

Microrganismos	Antibióticos		
	AB1	AB2	AB3
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	46,5	21,5	29,0
<i>S. mitis</i> (ATCC 903)	41,5	21,0	22,0
AB1: Amoxicilina	(10 µg/mL)		
AB2: Azitromicina	(15 µg/mL)		
AB3: Eritromicina	(15 µg/mL)		

No estudo da associação dos óleos essenciais sobre a ação dos antibióticos frente a *S. mutans*, verificou-se que os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. – OE1 e *Mentha piperita* – OE3 exerceram efeito antagônico sobre amoxicilina (10 µg/mL) – AB1. Enquanto, o óleo de *Eugenia uniflora* L. – OE2 mostrou um efeito indiferente frente a AB1. Na ação combinada de AB1 com cada óleo essencial frente a *S. mitis*, percebe-se que todos os óleos essenciais exerceram

efeito antagônico. Esses resultados evidenciam que o antibiótico amoxicilina quando associado aos óleos essenciais em estudo, podem ter seu efeito antibacteriano semelhante a sua forma isolada ou, em grande parte, sua atividade antibacteriana reduzida (Tabela 2).

Tabela 2: Ação combinada dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita* aos antibióticos amoxicilina, azitromicina e eritromicina. Observar interferência exercida por cada óleo, entendendo-se como: ↑ : efeito sinérgico; ↓: efeito antagônico; * efeito indiferente.

Associação (AB + OE)	Microrganismos	
	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>
AB1 + OE1	44,5 ↓	40,5 ↓
AB1 + OE2	46,5 *	36,0 ↓
AB1 + OE3	44,5 ↓	22,5 ↓
AB2 + OE1	30,0 ↑	21,0 *
AB2 + OE2	32,0 ↑	23,0 ↑
AB2 + OE3	27,0 ↑	25,0 ↑
AB3 + OE1	22,5 ↓	24,0 ↑
AB3 + OE2	36,0 ↑	33,0 ↑
AB3 + OE3	38,0 ↑	46,0 ↑

AB1: Amoxicilina (10 µg/mL)
 OE1: *Eucalyptus globulus* L. (Eucalipto)
 AB2: Azitromicina (15 µg/mL)
 OE2: *Eugenia uniflora* L. (Pitangueira)
 AB3: Eritromicina (15 µg/mL)
 OE3: *Mentha piperita* (Hortelã-pimenta)

Com relação à associação ao antibiótico azitromicina (15 µg/mL) - AB2, a Tabela 2 mostra que óleos essenciais exerceram um efeito positivo sobre a ação de AB2 em ambas as espécies bacterianas, estabelecendo efeito sinérgico em quase todas as combinações do quimioterápico com o produto natural, com exceção de OE1 (*Eucalyptus globulus* L.) que exerceu efeito indiferente sobre AB2 frente a *S. mitis*.

A Tabela 2 demonstra a ação ampliada que os óleos essenciais exerceram sobre o antibiótico eritromicina (15 µg/mL) - AB3, tendo apenas OE1 (*Eucalyptus globulus* L.) exercido efeito antagônico sobre AB3 em *S. mutans*. Uma ênfase deve ser dada a ação combinada do OE3 (*Mentha piperita*) com AB3, indicando halos de inibição bastante

expressivos, com diâmetros em torno de 38 mm para *S. mutans* e 46 mm para *S. mitis*.

DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais de forma apropriada vem ao encontro das proposições da Organização Mundial de Saúde (OMS), que tem incentivado a valorização das terapias tradicionais, sendo estas reconhecidas como recurso terapêutico muito útil nos programas de atenção primária à saúde, podendo atender muitas das demandas de saúde da população¹⁷.

Os óleos essenciais utilizados no estudo, *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita*, encontram-se entre as 71 plantas medicinais lançadas na lista do Ministério da Saúde em fevereiro de 2009¹⁸. Destaca-se que estas plantas descritas no referido documento poderão ser utilizadas como recurso terapêutico pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e devem ser exploradas em estudos e pesquisas que visem determinar sua eficácia clínica, justificando, assim a escolha das mesmas para realização deste estudo.

Ressalta-se que os microrganismos utilizados nesse estudo, *S. mutans* e *S. mitis*, estão, normalmente, relacionados a infecções odontogênicas, incluindo lesões de cárie dentária e infecções intra-radulares primárias, seja aguda ou crônica, tendo em vista a habilidade desses microrganismos em se alojar nos túbulos dentinários^{19,20,21,22}.

Neste estudo, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. mostrou alguma atividade sinérgica quando associado a azitromicina em *S. mutans* e eritromicina em *S. mitis*. Pesquisas demonstram que o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. tem atividade anti-séptica maior do que o seu principal constituinte ativo isolado, o cineol ou eucaliptol (representando 80% da composição). Assim, um óleo essencial apresenta uma composição complexa, algumas vezes, de centenas de diferentes compostos químicos, onde eles apresentam ação sinérgica ou complementar entre si, modalizando sua atividade²³.

Nas associações com o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L., ações sinérgicas importantes foram observadas quando da associação com azitromicina e eritromicina. Ogunwande et al.² em seu estudo relatam que os óleos essenciais obtidos a partir das folhas e frutos de *Eugenia uniflora* L.

possuem consideráveis atividades antibacteriana e citotóxica.

Efeito sinérgico relevante foi obtido com o óleo essencial de *Mentha Piperita*, visto que a associação deste óleo obteve grande efeito potencializador, chegando a duplicar o halo de inibição quando comparado ao do antibiótico isoladamente. Imai⁵ e Matos²¹ também relatam expressiva atividade antibacteriana do óleo essencial da *Mentha piperita*, descrevendo tal espécie vegetal como produtora de óleo essencial rico em mentol, mentona e mentofurano, sendo estes compostos mais abundantes nas folhas, fato de grande importância econômica na indústria farmacêutica.

Amoxicilina mostrou-se o antibiótico com os maiores halos de inibição de crescimento bacteriano quando utilizado isoladamente, ao passo que teve seu efeito antagonizado, ou seja, reduzido, quando associado aos óleos essenciais. Já os outros antibióticos, azitromicina e eritromicina, tiveram efeitos consideráveis em seu uso isolado, porém com halos de inibição menores do que os exercidos pela amoxicilina sobre os microrganismos. Efeito antibacteriano satisfatório de azitromicina e eritromicina foi alcançado, em sua maioria, pela associação com os óleos essenciais.

De uma forma geral, a característica da interferência exercida pelo óleo essencial sobre a ação dos antibióticos variou de acordo com o tipo do antibiótico, tipo do óleo essencial testado em associação, e tipo de cepa bacteriana ensaiada.

A escolha dos antibióticos sintéticos ocorreu em função de sua ampla utilização para tratamento de infecções orais, sendo, na maioria dos casos, utilizados como opção terapêutica de primeira escolha. Porém, deve-se reconhecer que os óleos essenciais obtidos a partir de plantas são considerados fontes promissoras para elaboração de fármacos utilizados no tratamento de infecções orais, mesmo considerando que os microrganismos envolvidos apresentam sensibilidade aos antimicrobianos sintéticos comerciais¹¹.

Pode-se apontar como limitações deste estudo o restrito número de microrganismos, mesmo considerando que os mesmos estão envolvidos com a maioria das infecções odontogênicas e não odontogênicas da cavidade bucal, além das dificuldades que os óleos essenciais apresentam para se difundirem no meio de cultura sólido, etapa fundamental, que possibilita o contato direto entre o produto e

as células bacterianas, promovendo a inibição do crescimento microbiano ou morte celular. Tais dificuldades são colocadas em função de características químicas inerentes ao óleo (volatilidade e insolubilidade em água) e ao meio de cultura (constituição hidrofílica)^{24,25}.

Destaca-se a escassez de estudos referentes à associação específica de antibióticos a óleos essenciais frente a bactérias envolvidas com infecções orais, indicando a necessidade de realização de outros ensaios microbiológicos pré-clínicos, como teste de associação em meio de cultura líquido, determinação da cinética de morte microbiana, além da elucidação de mecanismos de ação envolvidos com a inibição de crescimento e/ou morte microbiana. Tais ensaios embasarão, ainda, a realização de estudos experimentais para determinação de efeitos toxicológicos e clínicos.

Todos os efeitos exercidos pelos óleos essenciais aos antibióticos em estudo merecem atenção. Pois, de acordo com Oliveira et al.¹⁰, óleos essenciais apresentam capacidade de interferir sobre a atividade antibacteriana dos antibióticos sintéticos, seja através de um efeito antagônico ou sinérgico. Assim, o uso concomitante de produtos naturais e medicamentos convencionais merece uma maior atenção, visto ocorrer à possibilidade de atuar no tratamento de doenças de etiologia bacteriana.

CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que os óleos essenciais avaliados interferem na atividade dos antibióticos, em maior ou menor grau.

Os óleos essenciais analisados mostraram efeito inibitório sobre alguns dos antibióticos. Visto posto, uma atenção especial deve ser dada a tais associações, por uma possível interferência de substâncias contidas nas plantas medicinais exercerem frente a antibióticos de uso comum na clínica odontológica. Por outro lado, o óleo essencial *Mentha piperita* associado ao antibiótico eritromicina, mostrou efeito sinérgico bastante relevante, sugerindo a realização de mais estudos acerca da possível combinação.

REFERÊNCIAS

1. Lima EO, Farias NMP, Souza EL, Santos BHC. Propriedades Antibacterianas de Óleos essenciais de

- Plantas Medicinais. Rev Bras Ciênc Saúde 2003;7(3):251-258.
2. Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schimdt JM, Setzer, WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. Int J Aromath 2005;15(3):147-152.
 3. Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, et al. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Antimicrob Chemother 1995;35(3):421-424.
 4. Ferronato R, Marchesan ED, Bednarski F, Ribas TTZ, Onofre SB. Efeitos do óleo essencial produzido por *Baccharis dracunculifolia* D. C. (asteraceae) sobre bactérias cariogênicas. Arq Ciênc Saúde Unipar 2007;11(1):15-18.
 5. Imai H. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. Microbios. 2001;106:31-39.
 6. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine 2007;14(11):727-732.
 7. Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiol. Immunol. 2005;20(4): 221-225.
 8. Silveira LMS, Rosas LS, Olea RSG, Gonçalves EC, Fonseca Júnior DC. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. RBAC 2007;39(4):299-301.
 9. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PCD. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol 2000;31(4):247-256.
 10. Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacogn 2006;16(1):77-82.
 11. Shin S, Pyun M. Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. Phytotherapy Res 2004;18(1):827-830.
 12. Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screenig of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiol 2001;32(5):293-297.
 13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris SC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol 1996;45(3):493-496.
 14. Gayoso, CW, Lima EO, Oliveira VT, Pereira FO, Souza EL, Lima IO, et al. Sensitivity of fungi isolated from oychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. Fitoterapia 2005;76(2):247-249.
 15. Santos Filho L. Manual de microbiologia clínica. In: Meios de Cultura de Rotina: Finalidade e funcionamento. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB; 2001. p. 215-238.
 16. Cleeland L, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: Lorian VMD. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p.739-788.
 17. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto & Contexto Enferm 2006;15(1):115-121.
 18. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília; 2007.
 19. Lorenzo, JL. Microbiologia para o estudante de odontologia. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 55-72.
 20. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. Caries Res 2004; 38(1):204-11.
 21. Matos FJA. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. Fortaleza: EUFC; 1998. p. 201.
 22. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol 2007;7(5):257-262.
 23. Vitti AMS, Brito JO. Óleo Essencial de Eucalipto. Documentos Florestais: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo [periódico eletrônico]. 2003 Ago [citado em 2009 Mar 30]; 17: [26 páginas]. Disponível em: <http://www.ufra.edu.br/pet_florestal/downloads/oleos1.pdf>.
 24. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006;6(39):1-8.
 25. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn 2007;17(1):108-113.

Recebido em 07/07/2010

Revisado em 15/12/2010

Aceito em 27/12/2010