

Efeito Antibacteriano de Óleos Essenciais sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário

Antibacterial Effect of Essential Oils on Biofilm-forming Bacterial

LÍVIA ARAÚJO ALVES¹
IRLAN DE ALMEIDA FREIRES¹
RICARDO DIAS DE CASTRO²

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* - Eucalipto (OE1), *Eugenia uniflora* L. - Pitangueira (OE2) e *Mentha piperita* - Hortelã-Pimenta (OE3) sobre bactérias cariogênicas. **Material e Métodos:** Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais pela técnica da microdiluição sobre *Streptococcus mutans* (ATCC-25175), *S. salivarius* (ATCC-7073) e *S. mitis* (ATCC 903). Utilizou-se placa com 96 orifícios, onde foram inseridos em cada um 10 μ L do inóculo (10^8 UFC/mL), 100 μ L de caldo Brain Heart Infusion (HIMEDIA, São Paulo, Brasil) duplamente concentrado e 100 μ L dos óleos essenciais em concentrações que variaram de 5 a 0,039 mg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizada Clorexidina a 60 μ g.mL⁻¹. Ainda foram realizados os controles de crescimento bacteriano e de esterilidade do meio de cultura utilizado. A leitura foi feita após 24 horas pelo método visual, sendo observada a formação ou não de aglomerados de células ("botão") no fundo da cavidade da placa. **Resultados:** O OE1 inibiu crescimento bacteriano visível na concentração de 5 mg.mL⁻¹ sobre as três bactérias; OE2 mostrou CIM de 0,625 mg.mL⁻¹ e 3,75 mg.mL⁻¹ sobre *S. mitis* e *S. salivarius*, respectivamente. OE3 exibiu CIM de 0,625 mg.mL⁻¹, 0,312 mg mL⁻¹ e 1,25 mg mL⁻¹ sobre *Streptococcus mutans*, *S. mitis* e *S. salivarius*, respectivamente. **Conclusão:** Os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antibacteriana sobre as espécies cariogênicas ensaiadas.

DESCRIPTORIOS

Biofilme dentário. Óleos Voláteis. Testes de Sensibilidade Microbiana.

SUMMARY

Objective: To evaluate the *in vitro* antibacterial activity of essential oils of *Eucalyptus globulus* - Eucalyptus (EO1), *Eugenia uniflora* L. - Surinam cherry (EO2) and *Mentha piperita* - Peppermint (EO3) on cariogenic bacteria. **Material and Methods:** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the EOs was determined through the microdilution technique on *Streptococcus mutans* (ATCC-25175), *S. salivarius* (ATCC-7073) and *S. mitis* (ATCC903). It was used a plate containing 96 wells. **Into** each well were inserted 10 μ L of inoculum (10^8 CFU/mL), 100 μ L of Brain Heart Infusion Broth (HIMEDIA, Sao Paulo, Brazil) doubly concentrated and 100 μ L of the essential oils in concentrations ranging from 5 to 0.039mg.mL⁻¹. Chlorhexidine (60 μ g.mL⁻¹) was used as a positive control. Besides that, were also conducted controls regarding bacterial growth and sterility of the culture medium. The results were read after 24 hours by visual method, and it was observed the formation or non-formation of cellular clusters ("button") at the bottom of the plate's wells. **Results:** EO1 inhibited visible bacterial growth at a concentration of 5mg.mL⁻¹ on the three bacteria under study. MIC of 0.625mg.mL⁻¹ and 3.75mg.mL⁻¹ were showed by EO2 against *S. mitis* and *S. salivarius*, respectively. EO3 exhibited MIC of 0.625mg.mL⁻¹, 0.312mg.mL⁻¹ and 1.25mg.mL⁻¹ respectively on *S. mutans*, *S. mitis* and *S. salivarius*. **Conclusion:** The essential oils evaluated showed antibacterial activity against the cariogenic strains tested.

DESCRIPTORS

Dental Plaque. Oils, Volatile. Microbial Sensitivity Tests.

1 Aluno(a) de iniciação científica do curso de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

2 Professor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social da UFPB, Doutor em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela UFPB.

Considerando que as doenças mais prevalentes da cavidade bucal, cárie dentária e doenças periodontais, são de origem microbiana e que, atualmente, observa-se considerável aumento do número de microrganismos resistentes aos anti-sépticos e antibióticos convencionais, a atenção expressiva tem sido dada a utilização de compostos antimicrobianos de origem natural (FILOCHE, SOMA, SISSONS, 2005; AKINNIBOSUN *et al.*, 2008; DARWISH, ABURJAI, 2010). Essa crescente procura por novos compostos bioativos parte do conhecimento de que algumas plantas medicinais apresentam, com frequência, atividade antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2003; LUPI *et al.*, 2009). Para tanto, estudos experimentais são essenciais para confirmar as possíveis propriedades antibióticas de um grande número destas plantas e de seus produtos derivados (LIMA *et al.*, 2003).

A crescente procura de novos agentes antimicrobianos levou várias investigações para o efeito antimicrobiano de fitoconstituintes extraídos de uma série de plantas, muitas das quais foram utilizadas por muitos anos (FILOCHE, SOMA, SISSONS, 2005). Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais como agentes terapêuticos e principalmente com atividade antimicrobiana devem ser estimulados, com o intuito de descobrir novas drogas (COUTINHO *et al.*, 2003; LUPI *et al.*, 2009).

As plantas produzem compostos secundários que podem ser separados de acordo com as estruturas químicas em vários grupos, dentre eles os óleos essenciais, os quais apresentam atividades farmacológicas como anti-sépticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, dentre outras, que são muito utilizadas na medicina popular e para a fabricação de medicamentos (CARDOSO *et al.*, 2000).

Os componentes essenciais bioativos das plantas medicinais ou óleos voláteis, também conhecidos como óleos essenciais, apresentam-se promissores na terapêutica de doenças infecciosas (OGUNWANDE *et al.*, 2005). Tais substâncias, geralmente, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON *et al.*, 1995). 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 (IMAI, 2001; FERRONATTO *et al.*, 2007; ROSATO *et al.*, 2007) e eficácia clínica quando comparados a controles (ALBERTSON *et al.*, 2010).

Os óleos essenciais são quase sempre bacterios-táticos e, frequentemente, bactericida (RISSATO *et al.*, 2004). O *Eucalyptus globulus* L. é uma das árvores mais altas que se conhece, e das suas folhas extrai-se o óleo essencial, onde se encontra seu princípio ativo, cineol ou eucaliptol, responsável pela ação anti-séptica (CARDOSO *et al.*, 2000). As folhas da *Eugenia uniflora* L. são ricas em óleos essenciais contendo citronelol, geraniol, cineol, linalol e sesquiterpenos os quais têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana (AURICCHIO, BACCHI, 2003). O óleo essencial de *Mentha piperita*, ou popularmente hortelã-pimenta, compreende espécies com ação medicinal, sendo conhecidas, principalmente, pelo sabor característico e aroma refrescante (HABER *et al.*, 2005). E, dentre os seus principais componentes, destacam-se o mentol, mentona e cineol (WATANABE *et al.*, 2006).

Nessa perspectiva, o presente estudo objetivou avaliar atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. (Eucalipto), *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e *Mentha piperita* (Hortelã-pimenta) frente a cepas de *Streptococcus mutans*, *S. mitis* e *S. salivarius*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) 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.

Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita* foram fornecidos pela 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).

Quadro 1: Caracterização dos óleos essenciais sob estudo. João Pessoa-PB, 2010.

Óleo Essencial	Família	Nome Popular	Princípio Ativo	Propriedades	Lote
<i>Eucalyptus globulus</i> L.	Myrtaceae	Eucalipto	Cineol	Antiséptico, antimicrobiana, pulmonar, desinfetante, expectorante e sudorífera, tônico geral	nº144
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Pitanga	Linalol	Adstringente, analgésica, antimicrobiana, depurativa, digestiva, estimulante, refrescante, refrigerante e vermífuga	nº 248
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae (Labiatae)	Hortelã-pimenta	Mentol, mentona e cineol	Antiespasmódica, antiinflamatória, antimicrobiana, antiúlcera e antiviral	nº167

Preparação da emulsão dos óleos essenciais

As soluções dos óleos essenciais foram obtidas da seguinte forma: em tudo de ensaio esterilizado foi adicionado 1,6 mL de água destilada estéril, 400 µL do óleo essencial e 0,04 mL do agente emulsificante, TWEEN 80, sendo tal mistura agitada por cinco minutos utilizando aparelho Vortex. (ALLEGRINI *et al.*, 1973 adaptado). A partir de tal procedimento, obtiveram soluções com concentração final de 10.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada óleo essencial.

A inclusão de um agente emulsificante é um passo imprescindível para que haja uma mistura estável e homogênea, propiciando a difusão do óleo essencial no meio de cultura.

Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)

A atividade antibacteriana foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais, segundo a metodologia da microdiluição (microtécnica) proposta pelo NCCLS, (2003). Foram utilizadas microplacas estéreis com fundo em “U” contendo 96 orifícios. Cada orifício recebeu 100 µL do inóculo bacteriano, 100 µL do meio de cultura líquido BHI (duplamente concentrado) e 100 µL dos óleos essenciais em concentrações finais que variaram de 5.000 a 39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo o volume final de 100 µL.

O controle positivo foi a Clorexidina, variando na concentração de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, adicionada aos orifícios, juntamente com o inóculo e o meio de cultura líquido BHI (duplamente concentrado). O controle de crescimento foi constituído pelo inóculo e o meio líquido BHI (duplamente concentrado) e o controle de esterilidade foi determinado apenas pela presença do meio de cultura líquido BHI (duplamente concentrado).

A leitura para determinação da CIM dos óleos essenciais sobre as cepas avaliadas foi realizada através do método visual. Levou-se em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Desta forma, foi considerada como CIM, a menor concentração dos produtos em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos (NCCLS, 2003).

O ensaio foi realizado em duplicata e foi empregada análise descritiva dos dados.

RESULTADOS

Todos os óleos essenciais apresentam atividade bacteriostática sobre as linhagens bacterianas estudadas, com exceção do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L., que na concentração estudada não apresentou atividade bacteriostática sobre *S. mutans* (Quadro 2).

Quadro 2: Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais em estudo frente a *Streptococcus mutans*, *S. mitis* e *S. salivarius*. Valores expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. João Pessoa - PB, 2010.

Produtos Avaliados	CIM		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>Eucalyptus globulus</i> L.	5.000	5.000	5.000
<i>Eugenia uniflora</i> L.	—	468	3.750
<i>Mentha piperita</i>	625	312	1.250
Clorexidina (Controle)	0,4	0,4	0,4

DISCUSSÃO

A pesquisa de produtos a partir de espécies naturais (OLIVEIRA, KFFURI, CASALI, 2010) tem sido considerada uma das fontes mais promissoras de obtenção de novos princípios bioativos. Um grande número de plantas, inclusive as pouco conhecidas, é utilizado há muito tempo na medicina popular, quer seja nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos (SILVEIRA *et al.*, 2007). Dentre os constituintes das plantas medicinais, os óleos essenciais tornar-se-ão promissores como fontes de medicamentos naturais (OGUNWANDE *et al.*, 2005). É consensual a necessidade de introdução de novos compostos bioativos no arsenal terapêutico com efeito antimicrobiano, devido principalmente ao aparecimento de formas bacterianas resistentes, decorrente, sobretudo, do uso indiscriminado dos quimioterápicos antimicrobianos (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos como citral, pineno, cineol, cariofileno, mentol, elemeno, furanodieno, imoneno, linalol, eugenol, eucaliptol, carvacrol e outros. Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas (SOUZA *et al.*, 2005).

O óleo essencial apresenta, algumas vezes, uma composição complexa de centenas de diferentes compostos químicos, os quais apresentam ação sinérgica ou complementar entre si, modalizando sua atividade.

Para VITTI, BRITO, (2009), 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). O

que pode ser evidenciado pelos resultados do presente estudo, no qual o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. apresentou atividade antibacteriana na concentração de 5 mg.mL^{-1} sobre as três cepas avaliadas.

Os óleos essenciais obtidos a partir das folhas e frutos de *Eugenia uniflora* L. possuem consideráveis atividades antibacteriana e citotóxica (OGUNWANDE *et al.*, 2005). No estudo de AURICCHIO *et al.*, (2006), a atividade antimicrobiana da *Eugenia uniflora* L. parece depender de substâncias não voláteis, já que estas não estão presentes no extrato. Componentes do extrato responsáveis pela atividade antimicrobiana podem ser os polifenóis, particularmente os taninos. Devido ao fato do óleo essencial ser composto por substâncias bastante voláteis, este resultado pode sugerir a ausência de atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. na concentração utilizada no presente estudo sobre *S. mutans*.

No estudo de JOVITO *et al.*, (2009), avaliando-se a atividade antimicrobiana *in vitro* de um dentifrício contendo o extrato hidroalcoólico da *Eugenia uniflora* L. (pitanga) foi observado através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) halos de inibição de crescimento de *Streptococcus mutans* até a concentração de 1,25%.

Analisando a eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) observou-se diferenças significativas ao nível de 1% ($p=0,01$) ao se comparar as médias de UFCs/mL entre o spray teste (Pitanga) e o controle positivo, spray teste e controle negativo (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

A espécie vegetal produtora do óleo essencial de *Mentha piperita* elabora uma substância rica em mentol, mentona e mentofurano, sendo estes compostos mais abundantes nas folhas, fato de grande importância

econômica na indústria farmacêutica, por possuir uma elevada atividade antibacteriana (IMAI, 1998; MATOS, 2001).

O extrato de *Mentha piperita*, seja na forma de óleo essencial ou na de extrato alcoólico, segundo a literatura, apresenta propriedades antimicrobianas. O mentol é um importante componente presente nesses extratos e contribui para o potencial antimicrobiano dessa planta (MATOS *et al.*, 2009). Este potencial do óleo essencial de *Mentha piperita* foi comprovado neste estudo pelos resultados apresentados, mostrando atividade antibacteriana sobre *S.mutans*, *S. mitis* e *S. salivarius* com CIM de 0,625; 0,312 e 1,25 mg.mL⁻¹, respectivamente.

No estudo de RASOOLI *et al.*, (2008), a *Mentha piperita* apresentou acentuada atividade inibitória frente ao biofilme formado por *S. mutans*, sendo essa atividade superior à clorexidina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, apresentou também Concentração Bactericida Mínima (6000 ppm) inferior à clorexidina (8000 ppm), sobre o mesmo microrganismo.

Os resultados desta pesquisa propiciam a continuidade dos estudos sobre *Eucalyptus globulus* L., *Eugenia uniflora* L. e *Mentha piperita*, levando-se

em consideração suas potenciais atividades terapêuticas e a busca por novos compostos bioativos.

Embora tenham sido avaliadas cepas cariogênicas importantes, o presente estudo apresenta limitações quanto ao número restrito de espécies bacterianas testadas e apresenta-se como um ensaio preliminar de avaliação antibacteriana dos óleos essenciais. Sugere-se a realização de ensaios de cinética de morte microbiana bem como avaliações toxicológicas e clínicas para verificar a viabilidade de uso na odontologia.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, os óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* L. (Eucalipto), *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e *Mentha piperita* (Hortelã-pimenta) demonstraram potencial antibacteriano contra as cepas ensaiadas.

Incentiva-se, assim, o desenvolvimento de pesquisas com substâncias isoladas, na busca de alternativas terapêuticas que possam servir de subsídio para novas fontes racionais a partir de produtos naturais.

REFERÊNCIAS

- AKINNIBOSUN FI, AKINNIBOSUN HA, IBEH IN, OSAGHAE F. Antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn on five vegetative organisms. *Plant Archive*, 8(2): 563-568, 2008.
- ALBERTSSON KW, PERSSONA, LINGSTRÖM P, DIJKEN JWV. Effects of mouthrinses containing essential oils and alcohol-free chlorhexidine on human plaque acidogenicity. *Clin Oral Invest*, 14(1):107-112, 2010.
- ALLEGRI M, SIMÉON M, MAILLOS H, BOILOOT A. Émulsions et applications en microbiologie. *Travaux de La Société de Pharmacie de Montpellier*, 33(1): 73-86, 1973.
- AURICCHIO MT, BUGNO A, BARROS SBM, BACCHI EM. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Lat. Am. J. Pharm*, 26(1): 76-81, 2007.
- AURICCHIO MT, BACCHI EM. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. *Rev.Inst. Adolfo Lutz*, 62(1): 55-61, 2003.
- CARDOSO MG, GAVILANES ML, MARQUES MCS, SHAN AYKV, SANTOS BR, OLIVEIRA ACB, BERTOLUCCI SKV, PINTO APS. Óleos Essenciais. *Boletim Técnico - Série Extensão*, 8(58): 1-42, 2000.
- CARSON CF, COOKSON BD, FARRELLY HD, AND RILEY TV. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. antimicrob. Chemother*, 35(3): 421-424, 1995.
- DARWISH RM, ABURJAI TA. Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on *Escherichia coli*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(9): 1-9, 2010.
- FERRONATTO R, MARCHESAN ED, BEDNARKI F, RIBAS TTZ, ONOFRE SB. Efeitos do óleo essencial produzido por *Baccharis dracunculifolia* D. C. (asteraceae) sobre bactérias cariogênicas. *Arq. Ciênc. Saúde Unipa*, 11(1): 15-18, 2007.
- FILOCHE SK, SOMAK, SISSONS CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol. Immuno*. 20(4): 221-225, 2005.
- GABRE DF. *Manual do teste de tetrazólio*. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.
- HABER LL et al. Diferentes concentrações de solução nutritiva para o cultivo de *Mentha Piperita* e *Melissa Officinalis*. *Horticultura Brasileira*, 23(4): 1006-1009, 2005.

13. IMAI H. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*, 106(1): 39-31, 2001.
14. JOVITO VC, ALMEIDA LFD, FERREIRA DAH, MOURAD, PAULO MQ, PADILHA WWN. Avaliação *in vivo* de Dentifrício Contendo Extrato da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre Indicadores de Saúde Bucal. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 9(1): 81-86, 2009.
15. LIMA EO, FARIAS NMP, SOUZA EL, SANTOS BHC. Propriedades Antibacterianas de Óleos essenciais de Plantas Mediciniais. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 7(3): 251-258, 2003.
16. LUPI EPV, BRIZUELA CIS, JEIFETZ FC, ACOSTA CJS. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Rev Cuba Farm*, 43(4): 74-84, 2009.
17. MATOS BM, KOMIYAMA EY, BALDUCCI I, KOGA-ITO CY. Antifungal activity of *Mentha piperita* alcoholic extract on *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Rev Odontol UNESP*, 38(4): 244-248, 2009.
18. MATOS FJA. *Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades*. Fortaleza: EUFC, 1998.
19. NASCIMENTO GGF, LOCATELLI J, FREITAS PCD. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, 31(4): 247-256, 2000.
20. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (Approved standard M7-A6)*. 6 Ed: Wayne, 1-47, 2003.
21. OGUNWANDE IA, OLAWOREB NO, EKUNDAYOC O, WALKERD TM, SCHMIDT JM, SETZERD WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3): 152-147, 2005.
22. OLIVEIRA CB, SOARES DGS, BOMFIM IPR, DRUMOND MRS, PAULO MQ, PADILHA WWN. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga). *Cienc Odontol Bras*, 12(2): 29-34, 2009.
23. OLIVEIRA HB, KFFURI CW, CASALI VWD. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(2): 256-260, 2010.
24. RASOOLI I, SHAYEGH S, TAGHIZADEH M, ASTANEH SD. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res*, 22(9): 1162-1167, 2008.
25. RISSATO SR, ALMEIRDA MV, SILVA LC. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. *Saluvista*, 23(2): 209-222, 2004.
26. 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*, 14(11): 727-732, 2007.
27. 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*, 39(4): 299-301, 2007.
28. SOUZA EL, LIMA EO, FREIRE KRL, SOUSA CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. *Braz Arch Biol Technol*, 48(2): 245-250, 2005.
29. VITTI MAS, BRITO JO. Óleo Essencial de Eucalipto. *Documentos Florestais: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo* [periódico na Internet]. 2003 Ago [acesso em 2009 mar 30]; 17: 26-1. Disponível em: <http://www.ufrpa.edu.br/pet_florestal/downloads/oleos1.pdf>
30. WATANABE CH, NOSSE TM, GARCIA CA, PINHEIRO POVH N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8(4):76-86, 2006.

CORRESPONDÊNCIA

Lívia Araújo Alves
Av. Tertuliano de Castro, 620 – Bessa
58035-170 João Pessoa – Paraíba – Brasil

E-mail
liviaalves_odonto@yahoo.com.br