

POTENZIALITÀ DEGLI OLI ESSENZIALI NELLE MALATTIE INFETTIVE

Mondello Francesca, Antonietta Girolamo, Maura Di Vito

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Per più di mezzo secolo, la società umana si è affidata principalmente agli antibiotici e ai vaccini per trattare le infezioni microbiche. Nonostante il grande progresso in ambito medico e farmaceutico negli ultimi decenni, il trattamento tradizionale delle malattie infettive risulta spesso inefficace con un incremento delle allergie e delle reazioni farmacologiche dannose inattese. Un quinto dei decessi globali è dovuto alle malattie infettive, molte delle quali di origine batterica, le quali costituiscono la principale causa di morte per i bambini di età inferiore ai 5 anni (1).

L'uso indiscriminato degli antibiotici in ambito clinico, veterinario, agricolo ha portato all'emergere della farmaco-resistenza batterica (2, 3) e attualmente ci troviamo di fronte alla minaccia di superbatteri, cioè batteri patogeni resistenti alla maggior parte o a tutti gli antibiotici disponibili. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha messo chiaramente in evidenza che tali patogeni multi-resistenti potrebbero molto probabilmente portare il mondo all'epoca pre-antibiotica (4).

Fino ad ora, l'industria farmaceutica ha affrontato questo problema modificando gli antibiotici esistenti e sviluppandone di nuovi. Tuttavia, solo tre nuove classi di antibiotici (cioè lipopeptidi, ossazolidinoni, e streptogramine) sono entrate nel mercato della medicina negli ultimi quattro decenni e tutte solo per il trattamento delle infezioni dovute a batteri Gram positivi. Inoltre, i batteri hanno dimostrato di avere la capacità di sviluppare e diffondere la resistenza agli antibiotici prontamente, rendendo questa strategia sempre meno efficace. Ciò evidenzia chiaramente la necessità di nuovi agenti antimicrobici che abbiano fundamentalmente diverse modalità di azione rispetto a quella degli antibiotici tradizionali.

L'enorme domanda ha innescato interessi e sforzi a livello mondiale per lo sviluppo di nuove alternative antimicrobiche sicure ed efficaci. Tra i candidati potenziali più promettenti nella prevenzione e nel trattamento di diverse malattie infettive vi sono soprattutto prodotti di origine naturale per la loro esigua tossicità, biodegradabilità e il loro ampio spettro di azione rispetto alle sostanze antimicrobiche di sintesi.

In particolare numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che un gran numero di oli essenziali, misture vegetali volatili, con i loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per la loro attività antibatterica, antifungina, antivirale, antiparassitaria e per la loro attività antinfiammatoria e immunostimolante. Principalmente l'attività di questi fitoestratti e dei loro componenti è stata dimostrata, soprattutto *in vitro*, contro batteri multi-resistenti, come *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e/o contro funghi farmaco-resistenti opportunisti (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) dimostrando il potenziale notevole di questi prodotti naturali per contrastare lo sviluppo della resistenza microbica agli antibiotici. Inoltre, gli studi sull'uso degli oli essenziali e dei loro componenti in combinazione con antibiotici di sintesi sono risultati promettenti per poter limitare, con dosi meno tossiche per il paziente, tale problematica crescente.

Tuttavia spesso gli oli essenziali utilizzati nella ricerca non rispondono ai requisiti di buona qualità, in quanto si tratta di miscele non standardizzate di vari composti. Inoltre anche i dati microbiologico-clinici promettenti sono spesso insufficienti, aneddotici e non basati sull'uso di metodologie validate e di modelli sperimentali con buona predittività per l'uso clinico.

In questa relazione verranno riportate informazioni circa le attuali conoscenze sugli oli essenziali riguardo a efficienza antimicrobica, modalità di azione, specificità e sicurezza e vantaggi e svantaggi relativi a potenziali applicazioni cliniche (5-7).

Attività antimicrobica

Gli oli essenziali sono complesse miscele di sostanze organiche estratte da piante aromatiche mediante distillazione in corrente di vapore o spremitura, costituite prevalentemente da terpeni (biomolecole derivanti dalla ripetizione di catene idrocarburiche isopreniche).

Sono liquidi infiammabili, volatili a temperatura ambiente, oleosi, solubili negli oli, negli alcoli e nei solventi organici.

L'attività antimicrobica, valutata *in vitro* sia in forma liquida che gassosa, varia da un microrganismo all'altro e da un olio essenziale all'altro, ma è sempre dose-dipendente. È strettamente connessa alla composizione chimica e alla concentrazione dei loro costituenti, che non dipendono solo dalla specie, ma anche da altri fattori come la provenienza della pianta, la parte usata, lo stadio di sviluppo, le condizioni di crescita (temperatura, terreno, fertilizzanti, ecc.), la distillazione e le condizioni di conservazione.

È importante quindi prendere atto che per i suddetti motivi vi sarà una variabilità chimica ad ogni distillazione per cui si dovranno sempre effettuare delle metodiche di analisi chimica (gascromatografia, spettrometria di massa, rotazione ottica, indice di rifrazione, test agli infrarossi, ecc.), necessarie per attestare il rispetto degli standard richiesti, che saranno valide solo per il lotto preso in considerazione.

L'attività antimicrobica negli oli essenziali, oltre a dipendere dalla composizione chimica, è anche direttamente proporzionale alla tossicità (basso indice terapeutico) per cui è necessario avere una minima concentrazione inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) ottimale più bassa possibile per evitare effetti collaterali (8).

Per valutare l'attività antimicrobica degli oli essenziali in genere vengono utilizzati i metodi convenzionali utilizzati per testare gli antibiotici con tutte le caratteristiche di standardizzazione, ripetibilità e qualità del risultato richieste dagli organismi internazionali di controllo, quali EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*).

Le proprietà specifiche degli oli essenziali (quali volatilità, insolubilità, viscosità) richiedono però delle modificazioni dei suddetti metodi, perché si potrebbe avere una distribuzione non omogenea dell'olio, anche utilizzando un appropriato solubilizzante che deve essere inerte nei confronti del microrganismo testato.

Queste complesse miscele di sostanze volatili, potrebbero evaporare o decomporsi durante una lunga incubazione che deve quindi essere monitorata in tal senso. Altri fattori importanti che possono influenzare la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali sono anche l'inoculo, il terreno di coltura, la temperatura, le condizioni di crescita in aerobiosi o anaerobiosi, il tipo di solubilizzante (tween, DMSO, etanolo, agar), l'eventuale uso di sigillanti. Ad oggi, per tali motivi, manca ancora una standardizzazione delle metodiche.

In letteratura molti studi scientifici, principalmente *in vitro*, sono stati condotti con oli essenziali e componenti estratti da piante Lamiaceae, nei confronti di *S. aureus*, batterio patogeno ad elevato grado di morbilità e mortalità, sia in ospedale che in ambito comunitario, e

nei confronti del patogeno fungino umano opportunisto *Candida*, responsabile di patologie mucocutanee e in alcuni casi di gravi infezioni sistemiche, soprattutto in pazienti immunocompromessi nosocomiali.

La maggior parte degli oli essenziali studiati – isolati da Lamiaceae, tra cui *Lavandula* sp., *Thymus vulgaris* e *Zataria multiflora* – ha mostrato una notevole attività nei confronti di ceppi di MRSA, soprattutto *T. vulgaris* e *Z. multiflora*. Entrambi questi due oli essenziali presentano un'alta percentuale di timolo, monoterpene fenolico, il quale sembra abbia un ruolo importante nell'inibire la crescita di MRSA. Gli oli essenziali testati in combinazione con un agente antimicrobico di sintesi o con altri oli essenziali hanno mostrato effetti sinergici contro MRSA, in molti casi con una riduzione sostanziale della MIC, come ad esempio per l'olio essenziale di *Z. multiflora* in combinazione con vancomicina, o per l'olio essenziale di *Lavandula luisieri* in combinazione con l'olio essenziale di *L. angustifolia* o l'olio essenziale di *L. stoechas*.

Diversi componenti estratti dagli oli essenziali di *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Mentha piperita*, *Lavandula hybrida*, *Z. multiflora*, *T. vulgaris* sono stati testati contro *S. aureus*, e tutti hanno mostrato un'evidente attività inibitoria. Il carvacrolo, monoterpene fenolico presente nell'olio essenziale di origano e di timo, ha effetti specifici su *S. aureus* e *S. epidermidis* agendo sulla vitalità del biofilm e sulla morfologia delle cellule sessili. È noto come la formazione di biofilm sia uno dei meccanismi patogenetici coinvolti nelle infezioni correlate all'uso di dispositivi medici e sia anche responsabile della resistenza antimicrobica. Recenti studi hanno valutato l'azione di oli essenziali nei confronti di fattori virulenza secreti o correlati alla parete cellulare. Diverse concentrazioni di oli essenziali di *Perilla frutescens* (Lamiaceae) sopprimono l'espressione dell' α -tossina, dell'enterotossina A e B di *Staphylococcus* e della tossina della sindrome da shock tossico di *S. aureus* sia meticillino-sensibile che meticillino-resistente. Inoltre sono risultati attivi contro MRSA anche gli oli essenziali della famiglia Myrtaceae (*Cleistocalix operculatus*, *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia* Cheel) composte principalmente da monoterpene monociclici (es. 1,8-cineolo e terpinene-4-olo). Studi *in vitro*, hanno dimostrato che il singolo componente terpinene-4-olo (T-4-olo) presenta un'attività batteriostatica e battericida molto più forte rispetto a quella dell'olio essenziale di *M. alternifolia* (Tea Tree Oil, TTO) nei confronti di stafilococchi coagulasi negativi e MRSA.

Gli oli essenziali studiati, isolati da Lamiaceae, come *Z. multiflora*, *Ocimum sanctum*, *O. vulgare*, *O. majorana*, *M. piperita*, *Mentha suaveolens* con i loro componenti principali, oltre ad avere attività antibatterica, hanno mostrato anche notevole attività antifungina, in particolare anti-*Candida*. Tutti sono caratterizzati da un elevato contenuto di timolo, carvacrolo, cimene, linalolo o α -pinene. In particolare, timolo, carvacrolo e geraniolo sono anche in grado di inibire lo sviluppo della formazione del biofilm in *Candida*.

Giordani R. ha confrontato l'effetto anti-*Candida* di diversi tipi di *Thymus*, *O. majorana* e *R. officinalis* raccolti in Algeria. È il primo studio in cui viene dimostrata l'elevata attività dell'olio essenziale di *Thymus numidicus* (Lamiaceae) contro la *Candida* con una MIC 1357 volte superiore rispetto alla MIC di amfotericina. Il componente principale di questo olio essenziale è stato identificato nel timolo (9).

Molti studi sono stati effettuati sulla sinergia tra gli oli essenziali o i componenti e gli antibiotici convenzionali. In ogni caso, poiché i risultati variano in base al microrganismo, all'antibiotico e all'olio essenziale che vengono presi in considerazione, la combinazione di oli essenziali con i farmaci sintetici deve essere sempre attentamente considerata. Per esempio, nei confronti di *Candida* l'olio essenziale di *Pelargonium graveolens* ha dimostrato sinergia in combinazione con amfotericina B, mentre quelli di *M. piperita*, di *T. vulgaris* e di *R. officinalis* hanno mostrato effetti antagonisti (10).

Meccanismo di azione

Il meccanismo di azione degli oli essenziali nei riguardi dei microrganismi è complesso e ancora non è stato ben chiarito perché dipende da vari fattori: 1) dal tipo di potenza antimicrobica dei vari oli essenziali che a sua volta dipende dalla loro composizione chimica e quindi dalle loro caratteristiche prevalentemente idrofile o lipofile; 2) dal tipo di microrganismi ed è principalmente collegato alla struttura della loro parete cellulare.

A causa della variabilità delle quantità e dei componenti degli oli essenziali, è molto probabile che la loro attività antimicrobica non sia dovuta ad un unico meccanismo, ma a diverse modalità di azione a livello cellulare. L'idrofobicità consente agli oli essenziali di ripartirsi tra i lipidi della membrana cellulare batterica o fungina e mitocondriale, alterando le strutture cellulari e rendendole così più permeabili. Le perdite eccessive di ioni e molecole dalla cellula microbica condurranno poi inevitabilmente alla morte. Alcuni oli essenziali modulano la farmaco resistenza in diversi batteri Gram negativi minando i meccanismi di efflusso (11). I batteri Gram positivi in molti studi risultano più sensibili agli oli essenziali rispetto ai batteri Gram negativi.

L'azione degli oli essenziali verso i batteri Gram positivi e funghi sembra essere simile. Segni visibili della loro azione contro i lieviti, i dermatofiti e altri funghi filamentosi possono essere osservati con cambiamenti morfologici e funzionali micro e macroscopici. La maggior parte degli studi sul meccanismo di azione antifungina degli oli essenziali sono stati condotti su *Candida albicans*, il maggiore patogeno fungino umano. Gli oli essenziali sembrano agire prevalentemente con cambiamenti strutturali e funzionali delle membrane fungine, portando alla dispersione del citoplasma e alla morte cellulare. Si assiste quindi ad un blocco della sintesi delle membrane, inibizione della germinazione, riproduzione e respirazione cellulare. Gli studi principali si sono focalizzati molto sul meccanismo di azione del TTO, dimostrando l'alterazione della permeabilità delle cellule dei lieviti.

Studi preclinici

Gli studi preclinici con gli oli essenziali costituiscono un valido supporto sperimentale per studi di sicurezza d'uso e di efficacia degli oli essenziali nelle infezioni batteriche e fungine umane e rappresentano un contributo preliminare per lo sviluppo di una nuova generazione di antibiotici naturali a scopo terapeutico e preventivo. La maggior parte degli studi sono stati condotti per infezioni mucosali e sistemiche da *Candida* e per infezioni da dermatofiti. Verranno riportati solo alcuni esempi.

Il carvacrolo, il maggiore componente fenolico dell'olio essenziale di timo e di origano e l'eugenolo, il maggiore componente fenolico dell'olio essenziale di garofano sono stati usati in un modello sperimentale di vaginite e di candidosi orale nella ratta confermandone l'efficacia (12-14). L'applicazione vaginale di olio di geranio e del suo componente principale, il geraniolo, sopprime la crescita di *C. albicans* e l'infiammazione locale nella candidosi sperimentale murina (15).

L'efficacia *in vivo* dell'olio essenziale di timo e di perila (*Perilla frutescens*) tramite contatto con vapore degli oli essenziali è stato dimostrato in *tinea pedis* sperimentale in cavie infettate con *Trichophyton mentagrophytes*, dimostrando una potente azione anti-*Trichophyton* tramite contatto con solo vapore (16).

Si è dimostrato, per la prima volta, l'elevata attività antifungina di TTO al 5% e di T-4-olo 1% in un modello di infezione sperimentale di *C. albicans* nella ratta, modello molto stringente

e predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne, anche con l'uso di un ceppo resistente agli azolici (17, 18). Specificamente tre dosi post-challenge di TTO al 5% v/v e di T-4-olo all'1% v/v (paragonabili all'azione del TTO al 2,5% v/v) sono risultate altamente significative nel risolvere efficacemente l'infezione vaginale con *C. albicans*, resistente al fluconazolo, nelle ratte infettate sperimentalmente. Tuttavia TTO al 5% v/v risulta più attivo del T-4-olo 1% v/v nel risolvere l'infezione causata da *C. albicans* farmaco-resistenti.

Studi clinici

Nei pochi casi in cui sono stati effettuati degli studi clinici i dati sono promettenti, ma non ancora esaustivi. Inoltre la maggior parte degli studi è stata effettuata utilizzando il TTO. Precedenti studi clinici effettuati per convalidare l'efficacia clinica degli oli essenziali non sono stati considerati scientificamente validi dagli standard oggi in uso, perché in molti casi non sono stati condotti in condizioni controllate.

Sebbene alcuni di questi dati clinici indichino che molti oli essenziali possano essere efficaci come agenti terapeutici, sono necessari altri rigorosi studi clinici che dovranno considerare fattori come: la concentrazione finale ottimale dell'olio, la formulazione del prodotto, la durata e la frequenza del trattamento, eventuali effetti avversi che possono influenzare l'efficacia farmacologica, gli eventuali effetti tossici, e il costo-efficacia del potenziale trattamento terapeutico con gli oli essenziali.

Tossicità

La maggior parte degli oli essenziali, anche se "naturali", possono causare effetti tossici se somministrati ad alte dosi. La tossicità può essere studiata tramite saggi *in vitro* come test di citotossicità su linee cellulari animali o *in vivo* dove gli animali di laboratorio vengono esposti agli oli essenziali per valutarne gli eventuali effetti avversi. Qualche informazione è stata tratta anche da incidenti casuali avvenuti dopo ingestione o esposizione cutanea nell'uomo. Molti oli essenziali (tra cui oli essenziali di *Lavandula*, *Origanum*, *Melissa officinalis*) hanno mostrato tossicità anche a basse concentrazioni.

È stato postulato che uno dei meccanismi primari di citotossicità è dovuto al danno cellulare simile a quello riscontrato nei batteri e funghi. In generale questi dati *in vitro* non sono molto paragonabili in quanto vengono utilizzate diverse linee cellulari, diversi oli essenziali, dosi e tempi di esposizione.

Una misura della tossicità ampiamente accettata è la LD₅₀ che è la dose letale (*Lethal Dose*) per il 50% degli animali testati: la tossicità orale acuta varia da una dose di 1,4 g/kg per l'olio essenziale di *Ocimum basilicum* a una dose maggiore di 5 g/kg per l'olio essenziale di *Litsea cubeba* e di *Lavandula*. Gli oli essenziali possono essere tossici se applicati ad alte dosi sulla pelle come dimostrato dai valori LD₅₀ di tossicità dermica che variano da una dose di 4,8 g/kg a una dose maggiore di 5 g/kg.

Per quanto riguarda gli effetti tossici negli uomini in genere si sono riscontrati problemi di irritazione e di allergia in soggetti predisposti e le reazioni sono generalmente dose-dipendenti. In genere tali reazioni sono dovute all'uso di oli essenziali datati, esposti alla luce e all'aria che comportano la formazione di prodotti di ossidazione con un potenziale allergico più elevato (19, 20).

Conclusioni e prospettive future

Gli oli essenziali potrebbero costituire una possibile integrazione e, in alcuni casi estremi, un'alternativa all'antibiotico-terapia, in particolare nei casi refrattari alla terapia convenzionale. Infatti oltre a dimostrare una notevole attività antimicrobica, possiedono proprietà biologiche e terapeutiche multifunzionali (antinfiammatorie, immunomodulanti, ecc.).

I dati sperimentali in letteratura danno un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche e scientifiche sull'efficacia antimicrobica *in vitro* degli oli essenziali, anche nei confronti di specie microbiche farmaco-resistenti. Sperimentalmente è stato confermato anche che i principali componenti degli oli essenziali generalmente rappresentano il prodotto attivo della mistura. Presumibilmente, sarà più difficile per i batteri sviluppare resistenza verso le misture degli oli essenziali, costituite da numerose entità molecolari, piuttosto che rispetto ai singoli antibiotici generalmente costituiti da una singola molecola.

L'uso topico a livello cutaneo e mucosale potrebbe costituire la strategia più promettente al momento e l'attività dimostrata degli oli essenziali come potenzianti la penetrazione cutanea degli antisettici potrebbe essere applicata per prevenire le infezioni, anche farmacoresistenti, che si riscontrano in chirurgia e con l'uso di dispositivi medici.

Gli studi preclinici dimostrano l'elevata attività antifungina degli oli essenziali verso *C. albicans* in modelli di infezione sperimentale mucosale e sistemica murina, anche con l'uso di ceppi fungini resistenti. Tali indagini costituiscono un valido supporto sperimentale preclinico per studi di sicurezza d'uso e di efficacia. Ulteriori studi anche sul ruolo sinergistico con oli essenziali e con farmaci potrebbero anche essere utili per migliorare l'indice terapeutico di alcuni farmaci, come quelli antifungini, attualmente tossici per l'ospite alle dosi impiegate.

Purtroppo, ad oggi, gli studi clinici con gli oli essenziali sono scarsi e metodologicamente carenti, e inoltre sono poche le informazioni ottenute circa la sicurezza d'uso degli oli essenziali per via orale. Per l'eventuale uso clinico ci sono ancora molti problemi da affrontare quali la necessità di standardizzazione dei metodi di estrazione, dei criteri di qualità dell'olio essenziale testato e delle metodiche *in vitro*, in modo che la ricerca possa essere più sistematica e l'interpretazione dei risultati più facilitata. Sono necessarie inoltre ulteriori conferme scientifiche (studi pre-clinici, clinici, farmacocinetici, farmacodinamici, di tossicità) delle evidenze empiriche terapeutiche provenienti dalla tradizione clinica.

Bibliografia

1. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: WHO; 2014. Disponibile all'indirizzo: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1; ultima consultazione 8/4/15.
2. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:493-9.
3. Heuer OE, Hammerum AM, Collignon P, Wegener HC. Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clin Inf Dis* 2006;43:911-6.
4. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(12):894-6.
5. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal* 2012;27(1):13-39.

6. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23(2):136-41.
7. Hammer KA, Carson CF. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar H (Ed.). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester: John Wiley & Sons; 2011. p. 255-306.
8. Camporese A. *Oli essenziali e malattie infettive. Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali*. Milano: Tecniche Nuove (Ed). 1998
9. Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 2008;79(3):199-203.
10. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17(4):3989-4006.
11. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès JM, Amaral L, Bolla JM. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *J Antimicrob Chemother* 2009; 53(5):2209-11.
12. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(5):909-14.
13. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* 2004;8(3):217-26.
14. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhr A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(2):106-11.
15. Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye S, Yamaguchi H, Abe S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull* 2008;31(8):1501-6.
16. Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. *In-vitro* and *in-vivo* anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses* 2001;44(3-4):99-107.
17. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1223-9.
18. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.
19. Carson CF, Hammer KA. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: Thormar H (Ed.). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester: John Wiley & Sons; 2011. p. 203-38.
20. Carson CF, Hammer KA, Nielsen JB. Efficacy and safety of tea tree and other oils. In: Walters KA, Roberts MS (Ed.). *Dermatologic, cosmeceutic, and cosmetic development: therapeutic and novel*. New York: CRC Press; 2007. p. 437-52.