

# Atividade Inibitória de Óleos Essenciais Vegetais Frente à *Candida glabrata*, Resistente a Fluconazol

## Inhibitory Activity of Essential Oils Extracted From Plants Against Fluconazole-Resistant *Candida glabrata*

LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA<sup>1</sup>

JACQUELINE FELIPE DE PAULA<sup>2</sup>

ROSSANA VANESSA DANTAS DE ALMEIDA-MARQUES<sup>3</sup>

YURI WANDERLEY CAVALCANTI<sup>4</sup>

JOSIMERI HEBLING<sup>5</sup>

### RESUMO

**Introdução:** A candidose oral é uma infecção fúngica que se manifesta frequentemente em pacientes imunocomprometidos ou naqueles que fazem uso de prótese dental removível, associada a hábitos de higiene deficitários. Antifúngicos sintéticos, a exemplo do fluconazol, são utilizados no tratamento desta infecção; entretanto algumas cepas apresentam resistência a estes fármacos. **Objetivo:** Este estudo avaliou o efeito antifúngico dos óleos essenciais de *Persea americana* (abacate), *Cinnamomumzeylanicum* (canela – folha), *Cinnamomumcassia* (canela – casca) e *Cymbopogonwinterianus* (citronela), frente à *Candidaglabrata*. **Material e Métodos:** O screening da atividade antifúngica dos óleos foi determinado por difusão em meio sólido, utilizando um inóculo fúngico ajustado em  $1 \times 10^6$  UFC/mL. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica da microdiluição. Os óleos essenciais foram avaliados em concentrações entre 1000 µg/mL e 7,81 µg/mL, enquanto que os fármacos Fluconazol e Nistatina foram avaliados nas concentrações que entre 64 µg/mL e 0,5 µg/mL. **Resultados:** Os halos de inibição mensurados variaram entre 8,2 e 9,2 mm de diâmetro, respectivamente para *C. winterianuse* *C. cassia*. Os óleos essenciais de *C. winterianuse* e *C. zeylanicum* apresentaram CIM de 125 µg/mL, enquanto a CIM de *C. cassia* foi 62,5 µg/mL. A CIM dos fármacos utilizados como controle foram estabelecidas em 16 µg/mL (fluconazol) e 2,0 µg/mL (nistatina). O óleo essencial de *P. americana* não apresentou atividade antifúngica nas concentrações avaliadas. **Conclusão:** Conclui-se que os óleos essenciais de canela (casca e folha) e citronela apresentaram atividade antifúngica frente a cepa de *C. glabrata* resistente a fluconazol.

### DESCRIPTORIOS

Fitoterapia. *Candida*. Produtos com Ação Antimicrobiana.

### ABSTRACT

**Introduction:** Oral candidiasis is a fungal infection diagnosed mainly in patients with immunosuppression or in denture wearers with deficient hygiene habits. Synthetic antifungal agents, such as fluconazole, have been used to treat this infection, but some strains are resistant to these drugs. **Objective:** This study aimed to evaluate the antifungal effect of the essential oils from *Persia americana* (avocado), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon - leaf), *Cinnamomum cassia* (cinnamon - bark) and *Cymbopogon winterianus* (citronella) against *Candida glabrata*. **Materials and Methods:** The essential oils were screened for their antifungal activity using the solid medium diffusion method, with fungal inoculum adjusted to  $1 \times 10^6$  CFU/mL. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the microdilution technique. The essential oils were evaluated at concentrations ranging between 1,000 µg/mL and 7.81 µg/mL, while fluconazole and nystatin were evaluated at concentrations between 64 µg/mL and 0.5 µg/mL. **Results:** The zones of inhibition measured varied between 8.2 and 9.2 mm diameter for *C. winterianus* and *C. cassia*, respectively. The essential oils from *C. winterianus* and *C. zeylanicum* had MIC of 125 µg/ml, while *C. cassia* essential oil had MIC of 62.5 µg/ml. The drugs used as controls showed MIC values of 16 µg/mL (fluconazole) and 2.0 µg/mL (nystatin). *P. americana* essential oil showed no antifungal activity at the concentrations evaluated. **Conclusion:** We conclude that the essential oils from cinnamon (bark and leaf) and citronella showed antifungal activity against fluconazole-resistant *C. glabrata*.

### DESCRIPTORS

Phytotherapy. *Candida*. Products with Antimicrobial Action.

- 1 Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas (Área de Concentração: Dentística). Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Odontologia Restauradora, Universidade Estadual Paulista- UNESP. Araraquara. São Paulo. Brasil.
- 2 CD, Departamento de Odontologia, Faculdade de Imperatriz- FACIMP. Imperatriz. Maranhão. Brasil
- 3 Professora Doutora. Departamento de Odontologia, Faculdade de Imperatriz. Imperatriz. Maranhão. Brasil.
- 4 Bolsista de Pós-Doutorado (PNPD). Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba- UEPB. Campina Grande. Paraíba. Brasil.
- 5 Professora Doutora. Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Ortodontia e Odontopediatria, Universidade Estadual Paulista- UNESP. Araraquara. São Paulo. Brasil.

Espécies do gênero *Candida*, são leveduras comensais presentes na cavidade bucal<sup>1</sup>. Entretanto, esses microrganismos consistem no principal agente etiológico da candidose oral. Havendo rompimento do equilíbrio presente na cavidade oral, observa-se manifestação da doença, de forma que estas leveduras alteram sua morfogênese, passando ao estágio de hifas, bem como expressão de adesinas<sup>2,3</sup>. Neste momento iniciam o processo de invasão do epitélio oral, promovendo reação inflamatória<sup>4</sup> e instalação da doença.

A presença desta infecção está comumente associada a quadros clínicos de imunossupressão, principalmente observados em portadores do vírus HIV e diabetes, bem como frequente em usuários de próteses dentais em associação às condições de higiene oral deficitárias<sup>5</sup>. Rotineiramente o tratamento da candidose é realizado com a administração de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, de acordo com o sítio de colonização. Dentre os principais fármacos empregados, deve-se citar a nistatina e o fluconazol<sup>4</sup>.

Entretanto, o uso difundido e não controlado de tais fármacos podem induzir ao surgimento de cepas com resistência medicamentosa<sup>6</sup>, a exemplo da *C. glabrata*, resistente aos derivados azóis, como fluconazol e itraconazol<sup>7</sup>. Desta forma, a busca por novas substâncias capazes de controlar e debelar a infecção tem sido avaliada. Dentre estas, destaca-se a investigação acerca do uso de produtos de origem vegetal, geralmente óleos essenciais ou extratos alcoólicos de plantas<sup>8,9</sup>.

Estudos etnobotânicos demonstram o uso popular de espécies vegetais no tratamento da candidose oral<sup>10-12</sup>. Muitas destas espécies naturais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, flavonóides e lactonassessquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade antimicrobiana<sup>13,14</sup>.

A presença destes fitoconstituintes, em algumas espécies, podem representar efeito antimicrobiano, a exemplo de algumas já estudadas como *P. granatum* Linn (romã), *Melaleuca alternifolia* e *Schinusterebinthifolius* (aroeira vermelha)<sup>8,9,15</sup>. Entretanto, outros produtos de origem natural não têm sido extensivamente investigados quanto ao seu potencial antimicrobiano, principalmente pela presença de compostos como aldeído cinâmico em espécies como *Cinnamomum cassia*, e *Cinnamomum zeylanicum*<sup>16</sup>.

Espécies tropicais como *Cymbopogon winterianus* e *Persea americana*, apresentam alguns resultados quanto a ação antimicrobiana<sup>17,18</sup>, entretanto não demonstram resultados consistentes acerca deste efeito,

principalmente sobre gênero *Candida*. Assim, novos estudos avaliando o efeito destes produtos de origem natural têm sido realizados. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *P. americana* (abacate), *C. zeylanicum* (canela – folha) *C. cassia* (canela – casca) e *C. winterianus* (citronela), frente à *C. glabrata*.

## MATERIALE MÉTODOS

### Reativação das Espécies de *Candida* e obtenção do inóculo

A atividade antifúngica dos óleos essenciais foi determinada frente a *C. glabrata* (ATCC 2001) resistente ao Fluconazol. A cepa foi reativada em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Após incubação a 35°C por 24 horas, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e reincubadas. Em seguida, o conjunto foi centrifugado e as células planctônicas lavadas em solução de PBS estéril (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4). Essa suspensão foi padronizada de modo a atingir a concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, ajustada em espectrofotômetro (Spectronic 20, Bausch&Lomb Inc., Rochester, NY, USA), na densidade óptica de 0,25, no comprimento de onda 520 nm<sup>19</sup>.

### Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais

Foram utilizados os óleos essenciais de abacate (Ferquima Ind. e Com. Ltda., Vargem Grande Paulista, Brasil), canela (folha) (Ferquima Ind. e Com. Ltda., Vargem Grande Paulista, Brasil), canela da china (casca) (Empresa Viessence®, Florianópolis, Brasil), e citronela (Empresa Viessence®, Florianópolis, Brasil). As características físico-químicas e a composição dos principais fitoconstituintes desses produtos naturais são apresentadas no quadro 1.

O screening dos óleos foi determinado em meio Agar Sabouraud Dextrose, pelo método da difusão. Placas de petri contendo o meio foram inoculadas com a suspensão fúngica e inseridos discos de papel com 6 mm de diâmetro, previamente embebidos nos óleos essenciais em suas formulações puras. O mesmo processo foi realizado para a Nistatina (256ug/ml), fármaco utilizado como controle positivo. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C, por 24 h.

Os resultados foram avaliados a partir da mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento fúngico em milímetros (mm), com auxílio de um paquímetro. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo considerada a média aritmética dos valores obtidos.

### Preparo de soluções para determinação da Concentração Inibitória Mínima

As soluções dos óleos essenciais foram obtidas a partir da diluição dos mesmos em água, com o auxílio de um agente emulsificante (Tween 80)<sup>20</sup>, considerando-se o peso e a densidade. As diluições resultaram em soluções de trabalho na concentração de 4000 µg/mL, sendo os produtos ensaiados a partir da concentração 1000 µg/mL.

Para os antifúngicos Fluconazol e Nistatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), realizou-se a solubilização dessas drogas em água ultrapura (pH 7,0) e soluções de trabalho na concentração 256 µg/mL foram obtidas pela diluição das drogas em meio de cultura RPMI 1640, sendo os ensaios realizados a partir da concentração 64 µg/mL. Assim, as soluções dos produtos naturais foram ensaiadas entre o intervalo das concentrações 1000 µg/mL e 7,81 µg/mL, enquanto as soluções antimicrobianas utilizadas como controle farmacológico (Fluconazol e Nistatina) foram avaliadas nas concentrações que variaram entre 64 µg/mL e 0,5 µg/mL.

### Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos avaliados foi determinada segundo a normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), por meio da técnica da microdiluição em caldo<sup>21</sup>. Foram inseridos 100 µL de meio de cultura RPMI 1640 em todos os compartimentos de microplacas de 96 poços. Na primeira fileira, foram inseridos 100 µL das soluções de trabalho dos produtos, em seguida, realizaram-se diluições seriadas, por meio da

transferência de 100 µL aos poços subsequentes.

Por fim, foram inseridos 100 µL da suspensão dos microrganismos (concentração:  $1 \times 10^3$  CFU/mL), totalizando um volume final de 200 µL/poço. As placas foram incubadas a 35° C, por 48 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração dos antibióticos capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) foram realizados para garantir acurácia do método.

### RESULTADOS

O ensaio de *screening* determinou que apenas o óleo essencial de *P. americana*, não apresentou atividade antifúngica frente as leveduras (tabela 1). As demais amostras apresentaram valores médios entre 8,2 e 9,2 mm de diâmetro, havendo ampla discrepância quando comparados ao fármaco controle (nistatina).

A CIM, determinada pelo método da microdiluição, demonstrou que óleo essencial de abacate não apresentou atividade inibitória nas concentrações determinadas, entretanto para os demais produtos observou-se efeito antifúngico. Em especial, o óleo essencial de *C. cassia* apresentou atividade frente às duas espécies de *Candida* em uma mesma concentração (62,5 µg/mL), sendo este valor inferior ao encontrado para as substâncias utilizadas como controle farmacológico (quadro 2).

**Quadro 1. Especificações técnicas dos óleos essenciais utilizados no estudo, segundo laudo técnico expedido pelas empresas Ferquima e Viessence.**

Óleos essenciais	Impurezas	Densidade (g/mL, 20°C)	Principais componentes
<i>Persea americana</i> (Abacate)	Isento	0,908	Ácido Oléico Ácido Linoléico Ácido Palmítico
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela – folha)	Isento	1,030	Aldeído Cinâmico Acetato de cinamila 1,8-cineol
<i>Cinnamomum cassia</i> (Canela de china – casca)	Isento	0,912	Aldeído Cinâmico Benzoato de benzila α-pineno
<i>Cymbopogon winterianus</i> (Citronela)	Isento	0,891	Citronelal Geraniol Citronelol

**Tabela 1. Valores médios (em mm) dos halos de inibição produzidos pelos óleos essenciais frente à cepa fúngica.**

Óleo essencial	<i>C. glabrata</i> (ATCC 2001)
<i>P. americana</i> (Abacate)	0,0± 0,0
<i>C. zeylanicum</i> (Canela – folha)	8,7± 0,13
<i>C. cassia</i> (Canela – casca)	9,2± 0,13
<i>C. winterianus</i> (Citronela)	8,2± 0,13
Nistatina (controle)	23,0± 0,5

**Quadro 2. Valores da CIM (em µg/mL) determinadas pelos óleos essenciais frente à *C. glabrata*.**

Óleo essencial	CIM (µg/mL)
<i>P. americana</i> (Abacate)	> 1000
<i>C. zeylanicum</i> (Canela – folha)	125,0
<i>C. cassia</i> (Canela – casca)	62,5
<i>C. winterianus</i> (Citronela)	125,0
Nistatina (controle)	2,0
Fluconazol (controle)	16,0

## DISCUSSÃO

A busca por produtos que apresentem menor toxicidade aos tecidos sadios e maior efeito antimicrobiano, sem contudo permitir aumento da resistência de microrganismos, tem sido realizada. Estudos que avaliam os efeitos de produtos extraídos de espécies vegetais, têm determinado que estes demonstrem capacidade antimicrobiana frente aos mais diversos patógenos<sup>8,9,22</sup>. Desta forma, seriam uma alternativa ao uso de fármacos sintéticos.

Assim avaliou-se o efeito antifúngico dos óleos essenciais de *P. americana* (abacate), *C. zeylanicum* (canela – folha) *C. cassia*(canela – casca) e *C. winterianus*(citronela), frente à *C. glabrata*, usando dois métodos distintos para detecção desta atividade. Deste modo, o *screening* da atividade antifúngica, utilizando as soluções em suas formulações puras, determinou que o óleo de abacate não apresentou atividade. Frações hexânica, etanóica e metanólica do óleo de abacate não demonstraram efeito antimicrobiano frente a cepas de *C. albicans*(ATCC 10231)<sup>17</sup>. No entanto, outros resultados publicados determinam atividade antimicrobiana das frações metanólica e hexânica do extrato da semente de abacate<sup>23</sup>.

O efeito antifúngico do óleo essencial de *C. cassiae* *C. winterianus* foi determinado em alguns estudos, em cepas bacterianas ou fúngicas<sup>24, 25</sup>, no entanto existem diferenças em relação aos valores

médios dos halos de inibição, quando da avaliação em meio sólido. Os valores encontrados no presente estudo são inferiores àqueles encontrados em estudo previamente realizado, o qual determina valores, médios de halos de inibição de 35 mm, entretanto frente a *C. albicans*<sup>25</sup>. Apesar de serem espécies que compõem um mesmo gênero, estes microrganismos podem apresentar comportamentos distintos frente ao uso de substâncias antimicrobianas, de forma que *C. glabrata* ou *C. torpicalis* apresentam menor sensibilidade a agentes antifúngicos que a *C. albicans*<sup>26</sup>. Além disto, deve-se ressaltar que o método de difusão em ágar deve ser visto como qualitativo, não sendo tão acurado quanto a outros para a determinação da atividade antifúngica.

A CIM avaliada por meio da técnica da microdiluição, determinou que o óleo essencial extraído da casca da canela apresentou maior efeito inibitório, entretanto tendo um valor de CIM maior em comparação aos fármacos sintéticos utilizados como controles. Já o óleo essencial de citronela apresentou valores inferiores aos da casca da canela, no entanto este óleo apresenta em sua composição o geraniol, monoterpeneo extensamente estudado por suas propriedades antifúngicas<sup>27</sup>. É válido ressaltar que os fitoconstituintes presentes nos óleos essenciais não foram isolados, podendo os efeitos destas substâncias serem potencializados quando avaliados de forma individual.

O óleo essencial de *C. cassia* foi avaliado frente a isolados clínicos de *C. albicans* oriundos de pacientes



portadores de HIV, encontrando valores de CIM similares a 62,5 µg/mL, entretanto as amostras clínicas fúngicas demonstraram resistência ao uso da Nistatina (100.000UI)<sup>24</sup>. O principal componente deste óleo essencial é o aldeído cinâmico, o qual apresenta atividade antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* em uma concentração de 500 µM, além dos seus efeitos anti-inflamatórios<sup>16</sup>.

Outros estudos determinaram a CIM dos óleos essenciais de citronela e da casca da canela, as quais variaram entre 560 µg/mL a 78 µg/mL, principalmente frente a cepas de *C. albicans*, microrganismos prevalente na candidose oral<sup>18,20</sup>. Desta forma, diante da comparação entre resultados já descritos e os do presente estudo vale destacar que parâmetros metodológicos permitem divergências nos resultados, pois a técnica da microdiluição tem sido relatada em distintos meios de cultura a exemplos do RPMI 1640, YNB ou Caldo Sabouraud, bem como o ajuste da densidade óptica para confecção do inóculo fúngico. Desta forma, estes parâmetros devem ser levados em consideração quando da comparação dos estudos.

Um outro ponto a ser discutido é a forma de extração dos óleos essenciais, as quais permitem apresentar concentrações diferentes dos componentes

ativos nos produtos<sup>28</sup>. Pode-se observar diferenças entre os efeitos biológicos de compostos quando extratos alcoólicos, hidroalcoólicos, óleos essenciais ou infusos. Além disto, fatores como a região da planta escolhida para a extração da amostra, período de colheita e condições climáticas podem também alterar a presença de fitoconstituintes, dificultando a real avaliação dos efeitos antimicrobianos destes produtos<sup>29,30</sup>.

Diante do exposto, observa-se que os óleos essenciais de citronela e canela apresentaram efeitos positivos frente à inibição de crescimento de *C. glabrata*, podendo ser eventuais antifúngicos potentes no tratamento da candidose oral. Entretanto, estudos que avaliam de forma mais específica os efeitos antimicrobianos destes produtos devem ser realizados, para que possam ser empregados rotineiramente na clínica.

## CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de citronela e canela (folha e casca) apresentaram atividade antifúngica frente a *C. glabrata*, entretanto o óleo essencial de abacate não exerceu efeitos sobre o microrganismo.

## REFERÊNCIAS

- Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.* 2013; 9(9):e1003550.
- Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2010; 12(3):273-82.
- Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 12 (2):112-22.
- Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA (2011) *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 55 (1): 250-265.
- Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4):251-60.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Ochal Z. Susceptibility of *Candida albicans* to new synthetic sulfone derivatives. *Arch Pharm (Weinheim).* 2015; 348(2):132-43.
- Gomes PN, da Silva WJ, Pousa CC, Narvaes EA, Del Bel Cury AA. Bioactivity and cellular structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms grown in the presence of fluconazole. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(11):1274-81.
- Oliveira JA, da Silva IC, Trindade LA, Lima EO, Carlo HL, Cavalcanti AL, de Castro RD. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014; 2014:325670.
- Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronella. *Clin Oral Investig.* 2015. (prelo)
- Machado AC, Oliveira RC. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urun de uva Allemão*). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2014; 16(2): 283-89.
- Fenner R, Sortino M, Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine.* 2005;12(3):236-40.
- Silva MD, Dreveck S, Zeni ALB. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí - Indaial. *Revista Saúde e Ambiente.* 2009; 10(2): 54-64.
- 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; 3(6):158.
- van Wyk C. Drug resistant tuberculosis in South Africa—what level of risk justifies isolation? *Med Law.* 2009; 28(2):211-20.

15. Freires IA, Alves LA, Ferreira GL, Jovito Vde C, de Castro RD, Cavalcanti AL. A Randomized Clinical Trial of Schinusterebinthifolius Mouthwash to Treat Biofilm-Induced Gingivitis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:873907.
16. Muhammad JS, Zaidi SF, Shaharyar S, Refaat A, Usmanghani K, Saiki I, Sugiyama T. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. *Biol Pharm Bull*. 2015; 38(1):109-15.
17. Tarfa FD, Obodozie O, Mshelia E, Ibrahim K, Temple VJ. Evaluation of phytochemical and antimicrobial proprieties of leaf extract of phytochemical and antimicrobial proprieties of leaf extract of *Tapinanthuasessifolius* (P. Beauv) van Tiegh. *Indian J Exp Biol*. 2004 Mar;42(1):326-329.
18. de Oliveira WA, de Oliveira Pereira F, de Luna GC, Lima IO, Wanderley PA, de Lima RB, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* against *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2011; 42(2):433-41.
19. da Silva WJ, Seneviratne J, Samaranyake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010; 94(1):149-56.
20. Cavalcanti YW, Almeida LFD, Padilha WVN. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. *ROBRAC* 2011; 20(52):77-82.
21. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard. CLSI Document M27-A3. 2008; Wayne, PA: CLSI.
22. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol*. 2008; 54(11):950-6.
23. Leite JJ, Brito EH, Cordeiro RA, Brilhante RS, Sidrim JJ, Bertini LM, Morais SM, Rocha MF. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(2):110-3.
24. Almeida LFD, Cavalcanti YW, Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica e alterações morfológicas induzidas pelo óleo essencial de *Cinnamomum cassia* frente cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2012; 12(3): 393-98.
25. Cavalcanti YW, Perez ALAL, Xavier GD, Almeida LFD. Efeito inibitório de óleos essenciais sobre microrganismos do canal radicular. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2011; 40(5): 208-214.
26. Biaño M, Krzyżko-Łupicka T, Koszałkowska M, Wiczorek PP. The influence of chemical composition of commercial lemon essential oils on the growth of *Candida* strains. *Mycopathologia*. 2014; 177(1-2):29-39.
27. Settanni L, Palazzolo E, Guarrasi V, et al. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*. 2012; 26 (2):326-30.
28. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Trindade RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17 (1): 108-13.
29. Freire CM, Marques MO, Costa M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105(1-2):161-6.
30. Carvalho CA, Silva MB, Oliveira TG, Lima JM, Rosa, MB. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. capitata. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(2): 249-57.

---

#### Correspondência

Prof. Dr<sup>a</sup>. Josimeri Hebling, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara, SP, Brasil. Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brasil.  
e-mail: jhebling@foar.unesp.br.

---