

Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp.

Ricardo Dias de CASTRO^a, Edeltrudes de Oliveira LIMA^b

^aDepartamento de Clínica e Odontologia Social, UFPB – Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB – Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa – PB, Brasil

Castro RD, Lima EO. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus globulus* L. on *Candida* spp. Rev Odontol UNESP. 2010; 39(3): 179-184.

Resumo

Considerando a necessidade de obtenção de novos agentes terapêuticos voltados para o combate da candidose bucal, o objetivo deste estudo foi investigar a atividade antifúngica in vitro do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) frente a espécies de *Candida* envolvidas com infecções bucais. Para tanto, ensaios microbiológicos com finalidade de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram realizados, respectivamente, utilizando as técnicas da microdiluição e do crescimento de unidades formadoras de colônias em meio sólido. Para o óleo essencial de *E. globulus* L. foram observadas CIM de 312,5 µg.mL⁻¹ para 76,2% das cepas de *Candida* e CFM de 625 µg.mL⁻¹ para 81% das cepas ensaiadas. Todas as cepas foram sensíveis aos antifúngicos sintéticos, miconazol e nistatina, utilizados como controles. Diante das condições estudadas e dos resultados obtidos, foi possível concluir que o óleo essencial de *E. globulus* L. apresentou atividade antifúngica sobre as espécies de *Candida*.

Palavras-chave: *Eucalyptus globulus* L.; candidíase bucal; *Candida* spp.; estomatite sobre prótese; produto com ação antimicrobiana.

Abstract

Considering the need to obtain new therapeutic agents aimed at acting against oral candidiasis, the objective of this study was to investigate the in vitro antifungal activity of the essential oil from *Eucalyptus globulus* L. (Eucalyptus) on *Candida* species involved in oral infections. Therefore, microbiological assays with the purpose of determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC) were performed, respectively, by using the technique of microdilution and the technique of colonies forming units growth on solid medium. For the essential oil from *E. globulus* L. were observed MIC of 312.5 µg.mL⁻¹ for 76.2% of the *Candida* strains and MFC of 625 µg.mL⁻¹ for 81% of the strains under study. All strains were sensitive to the synthetic antifungal agents, miconazole and nystatin, used as controls. From the conditions studied and from the results obtained, it's concluded that the essential oil from *E. globulus* L. showed antifungal activity on the *Candida* species.

Keywords: *Eucalyptus globulus* L.; oral candidiasis; *Candida* spp.; stomatitis on prosthesis; product with antimicrobial action.

INTRODUÇÃO

A candidose bucal tem sido definida como uma infecção causada por fungos presentes na microbiota da cavidade bucal, sendo as espécies de *Candida* as mais relacionadas à doença. Tais espécies são frequentemente designadas como patógenos oportunistas, que comumente são isolados da cavidade bucal, intestino e vagina, estando associados a infecções sistêmicas e superficiais.¹ *Candida albicans* tem sido designada como a

espécie fúngica com maior capacidade para formar biofilme, inclusive sobre hidroxiapatita (mineral que compõe a estrutura dentária) e resina acrílica (material utilizado na confecção de próteses dentárias), o que ajuda compreender sua expressiva patogenicidade.^{2,3}

Os mecanismos moleculares envolvidos com a virulência da *Candida* spp. estão relacionados à ativação da via de transdução

de sinal MAP (mitogen-activated protein) cinase, onde respostas celulares envolvidas com crescimento invasivo, formação de parede celular, adaptação ao estresse osmótico e reprodução ocorrem mediante vias de sinalização intracelular como MKC1, Cek1/2 e HOG1 MAP Kinase.⁴ Outras vias de sinalização intracelular, como p38 MAPK, também estão envolvidas com a patogenicidade da *C. albicans*.⁵ Uma vez instalada a infecção, mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 α e IL-2 α , são sintetizados e, conseqüentemente, induzem a resposta inflamatória.⁶

Diante da possibilidade de infecção por esses patógenos, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, usuários crônicos de antimicrobianos e portadores de prótese dentária total, alguns antifúngicos sintéticos, como a nistatina e miconazol, têm sido propostos no tratamento da doença.⁷ Porém, diante das limitações para o uso desses fármacos, como evidência de resistência microbiana, alto custo e ocorrências de efeitos indesejáveis, algumas substâncias de origem natural têm sido apontadas como possibilidades de tratamento, haja vista sua reconhecida atividade antifúngica.^{8,9}

Nesse sentido, extratos obtidos a partir do *Eucalyptus globulus* L., espécie vegetal conhecida popularmente como eucalipto-comum, têm sido amplamente utilizados em pesquisas científicas que buscam reconhecer sua atividade antifúngica.

Essa atividade tem sido atribuída, principalmente, à presença de eucaliptol e cineol, encontrados com freqüência no óleo essencial.¹⁰⁻¹³ *E. globulus* pertence à família as Myrtaceae, é uma espécie vegetal de grande porte, de folhas perenes, sendo amplamente utilizada na fabricação de papel. Seu uso medicinal é embasado pelo conhecimento popular, que relata expressiva ação anti-séptica, desinfetante e expectorante¹⁴. Ogunwande et al.¹⁵ destacam que 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 infecciosas. Tais substâncias, geralmente, são agentes que apresentam atividade antimicrobiana para um grande número de microrganismos incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos.¹⁶

Além das infecções micóticas superficiais em mucosas da cavidade bucal, as espécies de *Candida* podem estar envolvidas com lesões de cárie dentária,^{2,17} infecções periodontais e endodônticas,¹⁸⁻²⁰ evidenciando a necessidade de controle de crescimento desses microrganismos. Para tanto, a utilização de produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, tem sido apontada como forma alternativa para tratamento de infecções. Diante dessa premissa, investigações vêm sendo realizadas na perspectiva de se conhecer as propriedades biológicas e terapêuticas de extratos obtidos a partir do *E. globulus*, espécie vegetal cultivada em várias partes do mundo.^{21,22}

A atividade antimicrobiana de *E. globulus* é evidenciada por alguns estudos encontrados na literatura, que buscaram determinar, em sua maioria, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a bactérias e fungos envolvidos com infecções sistêmicas.^{10,11,23-25} Porém, existe uma escassez de informações

referentes à sua atividade contra fungos envolvidos com infecções da cavidade bucal.

Diante do exposto, considerando efetiva a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. globulus*, foi objetivo desse estudo avaliar, in vitro, a atividade antifúngica do óleo essencial de *E. globulus* L. para espécies de *Candida* associadas a infecções da cavidade bucal.

MATERIAL E MÉTODO

1. Local da Pesquisa e Cepas Fúngicas

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, que disponibilizou as cepas de *C. albicans* (ATCC 7615, ATCC 76485, LM052, LM03, LM12, LMV42, LM15 e LM766), *Candida tropicalis* (ATCC 13803, LM37, LM04, LM13, LM14 e LM15), *Candida guilhermondii* (LM01, LM30 e LM70) e *Candida krusei* (ATCC 6258, LM08, LM12 e LM120).

2. Solução de *E. globulus* L.

O óleo essencial que teve a atividade antifúngica avaliada foi obtido na Ferquima Ind. e Com. Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), sendo seus parâmetros físico-químicos descritos pelo fornecedor, que produz e comercializa óleos essenciais em escala industrial.

A emulsão do óleo essencial de *E. globulus* L. foi obtida seguindo as proporções sugeridas pelo protocolo recomendado por Alegrinni et al.,²⁶ onde em um tubo de ensaio foram adicionados 0,4 mL do óleo essencial, 0,04 mL de TWEEN 80 e q.s.p. 5 mL de água destilada estéril, sendo tal mistura agitada por 5 minutos em aparelho Vortex.

3. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do óleo essencial foi realizada através da técnica da microdiluição²⁵. Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de caldo Sabouraud dextrose (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição contendo 96 cavidades, com fundo em forma de "U", com tampa (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram distribuídos 100 μ L da emulsão do óleo essencial de *E. globulus* L., a uma concentração inicial de 10 mg.mL⁻¹, que através de diluições seriadas, à partir da retirada de uma alíquota de 100 μ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Nos orifícios de cada coluna foram dispensadas alíquotas de 10 μ L do inóculo correspondente a cada cepa ensaiada.

Como controle negativo, foi verificada viabilidade das cepas de leveduras ensaiadas, com a inoculação da suspensão fúngica no meio de cultura sem adição de antifúngicos. Ainda, realizou-se controle positivo a partir da utilização dos antifúngicos miconazol e nistatina, considerados padrões na utilização clínica, pela técnica da microdiluição, em concentrações de 32 e 64 μ g.mL⁻¹, respectivamente²⁷. Estes antifúngicos foram obtidos em farmácia de manipulação na forma de pó.

Os ensaios foram desenvolvidos em duplicata, sendo realizado, portanto, dois experimentos para cada cepa estudada. As microplacas foram incubadas a 35° C durante 24-48 horas. A leitura para determinação da CIM do óleo essencial sobre as cepas de leveduras foi feita a partir do método visual, onde foi considerada a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Dessa forma, considerou-se como CIM, a menor concentração do produto em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas de leveduras utilizadas nos ensaios microbiológicos.²⁷

Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, uma alíquota de 10 µL do corante 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio (Sigma-Aldrich®, USA) foi dispensada nas placas 24 horas após incubação. Esse corante reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração celular microbiana. Pela hidrogenação do 2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusa, a trifênil formazan. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas, que mantêm a sua cor.^{28,29}

4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após determinação da CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles positivos foram subcultivados em placas de agar Sabouraud dextrose, desprovido de qualquer antifúngico. Após 24 horas de incubação a 30 °C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração da droga que impediu o crescimento visível do subcultivo.^{30,31}

RESULTADO

Todas as cepas de *Candida* utilizadas no presente estudo apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de *E. globulus* L., onde a CIM foi de 312,5 µg.mL⁻¹, causando inibição de crescimento sobre 76,2% das cepas utilizadas no ensaio (Tabela 1). As cepas de *C. albicans* (ATCC 76615, ATCC 76485 e LM 052), *C. tropicalis* LM 13 e *C. krusei* ATCC 6258 apresentaram-se como as mais sensíveis, com CIM de 39 µg.mL⁻¹, e a *C. albicans* (LM 12, LMV

Tabela 1. CIM (µg.mL⁻¹) e CFM (µg.mL⁻¹) do óleo essencial do *Eucalyptus globulus* L., nistatina e miconazol frente às espécies de *Candida*

Espécies	CIM OE	CFM OE	CIM NY	CFM NY	CIM MIC	CFM MIC
1. <i>C. albicans</i> ATCC 76615	39	39	32	64	16	32
2. <i>C. albicans</i> ATCC 76485	39	78,1	32	64	16	32
3. <i>C. albicans</i> LM 052	39	781	32	64	16	32
4. <i>C. albicans</i> LM 03	625	78,1	32	64	16	32
5. <i>C. albicans</i> LM 12	1250	2500	32	64	16	32
6. <i>C. albicans</i> LM V42	1250	1250	32	64	16	32
7. <i>C. albicans</i> LM 15	312,5	625	32	64	16	32
8. <i>C. albicans</i> LM 766	1250	5000	32	64	16	32
9. <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	78,1	156,3	32	64	16	32
10. <i>C. tropicalis</i> LM 37	78,1	156,3	32	64	16	32
11. <i>C. tropicalis</i> LM 04	1250	5000	32	64	16	32
12. <i>C. tropicalis</i> LM 13	39	78,1	32	64	16	32
13. <i>C. tropicalis</i> LM 15	156,3	156,3	32	64	16	32
14. <i>C. tropicalis</i> LM 14	312,5	312,5	32	64	16	32
15. <i>C. guilliermondii</i> LM 30	312,5	312,5	32	64	16	32
16. <i>C. guilliermondii</i> LM 01	156,3	312,5	32	64	16	32
17. <i>C. guilliermondii</i> LM 70	312,5	625	32	64	16	32
18. <i>C. krusei</i> ATCC 6258	39	78,1	32	64	16	32
19. <i>C. krusei</i> LM 08	78,1	156,3	32	64	16	32
20. <i>C. krusei</i> LM 120	156,3	156,3	32	64	16	32
21. <i>C. krusei</i> LM 12	156,3	156,3	32	64	16	32

42 e LM 766) e *C. tropicalis* LM 04 entre as mais resistentes, com CIM de 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ressaltam-se diferenças encontradas intra-espécies, estando as de coleção clínica entre as mais resistentes.

No teste para avaliação da atividade fungicida, foi observado que a concentração de 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *E. globulus* L. foi capaz de promover morte celular em 81% das espécies avaliadas (Tabela 1), sendo a *C. albicans* ATCC 76615 a mais sensível, com CFM de 39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as cepas de *C. albicans* LM 766 e *C. tropicalis* LM 04 as mais resistentes, com de CFM de 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Foi observado que a nistatina apresentou CIM e CFM de, respectivamente, 32 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre todas as cepas avaliadas. Em relação ao miconazol, foram observadas CIM e CFM de, respectivamente, 16 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre 100% das cepas. Ainda é importante destacar que a partir do controle negativo, indicativo de crescimento celular fúngico, foi possível verificar viabilidade de todas as cepas ensaiadas.

Destaca-se que no presente estudo os dados obtidos sofreram tratamento estatístico descritivo, com a utilização de médias aritméticas dos valores de CIM e CFM dos produtos antifúngicos avaliados (*E. globulus*, nistatina e miconazol) em dois momentos distintos. Ressalta-se que experimentos para a determinação de CIM e CFM, como descritos neste estudo, não apresentam variabilidade dos dados obtidos, não necessitando, portanto, de tratamento estatístico inferencial.

DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa reforçam a informação de que o óleo essencial de *E. globulus* apresenta atividade antimicrobiana, especialmente antifúngica, com a vantagem de ser um produto natural.

Apesar dos achados, não foi encontrado na literatura nenhuma investigação prévia para determinação da CFM do óleo essencial de *E. globulus* sobre cepas de *Candida* envolvidas com infecções da cavidade bucal. Dessa forma, o reconhecimento dessa atividade farmacológica, apresentada por este estudo, representa uma informação de importância para avaliação da viabilidade de obtenção de produto para utilização clínica³². Dentre os microrganismos avaliados neste estudo, destacam-se a *C. albicans* e *C. tropicalis*, que são as espécies encontradas em maior frequência na cavidade bucal e que têm expressivo potencial para formar biofilmes³³. Para estas espécies, foi possível observar susceptibilidade ao óleo essencial de *E. globulus* em concentrações de até 39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados deste estudo corroboram indiretamente com os achados obtidos por outras pesquisas que utilizaram diferentes metodologias. Alzamora et al.¹¹ observaram halo de inibição de 14mm sobre *Candida* spp., por meio de testes de difusão em meio de cultura sólido. Utilizando a técnica de diluição em agar, Agarwal et al.¹⁰ também puderam constatar esta atividade, indicando CIM de 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Uma importante característica dos óleos essenciais e seus componentes é sua hidrofobicidade, que permite sua interação com estruturas celulares que tem constituição lipídica, promovendo aumento da permeabilidade, o que pode provocar uma saída extensiva de eletrólitos, indispensáveis à sobrevivência celular³⁴. Esse fato indica um possível mecanismo de ação do óleo essencial do *E. globulus* sobre as cepas de *Candida*. Estudos futuros são necessários para confirmar essa hipótese.

Nascimento et al.³⁴ ressaltam que há muito tempo diversas investigações científicas tem procurado confirmar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. O tema tem despertado uma preocupação quanto aos métodos desenvolvidos para investigações in vitro, principalmente em relação à confiabilidade, reprodutibilidade e validade dos dados, já que os óleos essenciais apresentam particularidades como: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade química, características que interferem significativamente nos resultados. Isso, de certa forma, ajuda a compreender a complexidade para realização de estudos que avaliam a atividade antimicrobiana desses óleos³⁵. Assim, nesta pesquisa buscou-se minimizar tais problemas a partir da escolha de um método para determinação da CIM utilizando meio de cultura líquido, que proporciona maior contato entre a substância avaliada e as células fúngicas. Além disso, foi utilizado um agente emulsificante, TWEEN 80, que permite uma devida diluição do óleo essencial do *E. globulus* em água.

É importante destacar que este estudo tem um caráter elucidativo inicial e apresenta como limitação a utilização de cepas isoladas, pois esta condição não reproduz situações clínicas, que indicam formação de biofilmes, que são consideravelmente mais resistentes aos produtos antimicrobianos.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de se avaliar a atividade antifúngica do *E. globulus* a partir da realização de outros estudos antimicrobianos in vitro, na perspectiva de se compreender melhor o potencial farmacológico do produto para produção de um fármaco e sua possibilidade de utilização clínica. Dentre estes ensaios pré-clínicos, destacam-se a determinação da curva de morte microbiana, do provável mecanismo de ação (ensaio com sorbitol), além dos estudos para avaliar os efeitos do óleo essencial sobre a micro e macromorfologia das células fúngicas.

Os resultados sugerem que o óleo essencial de *E. globulus* pode ser um promissor antifúngico de origem natural para tratamento de infecções fúngicas localizadas em tecidos bucais.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que as cepas de *Candida* envolvidas com infecções da cavidade bucal utilizadas no presente estudo in vitro foram susceptíveis ao óleo essencial do *Eucalyptus globulus* L.

REFERÊNCIAS

1. Thein ZM, Samaranyake YH, Samarayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006; 51: 672-80.
2. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. Biointerfaces. 2004; 33: 235-41.
3. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms: an update. Eukaryot Cell. 2005; 4: 633-8.
4. Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. Microbiol. 2006; 152: 905-12.
5. Müller V, Viemann D, Schmidt M, Endres N, Ludwig S, Leverkus M, et al. *Candida albicans* triggers activation of distinct signaling pathways to establish a proinflammatory gene expression program in primary human endothelial cells. J Immunol. 2007; 179: 8435-45.
6. Orozco A, Zhou X, Filler SG. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. Infect Immun. 2000; 68: 1134-41.
7. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svdzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40: 272-6.
8. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiol. 1999; 145: 2701-13.
9. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Manazir AS, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. Molecules. 2008; 13: 1-12.
10. Agarwal V, Lal EP, Pruthi EV. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. Mycopathologia. 2008; 165: 13-9.
11. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernandez G. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. An Fac Med (Peru). 2001; 62: 156-61.
12. Ghedira K, Goetz P, Jeune RL. *Eucalyptus globulus* Labill. Phytothér. 2008; 6: 197-200.
13. Sartorelli P, Marquiere AD, Amaral-Baroli A, Lima MEL, Moreno PRH. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. Phytother Res. 2007; 21: 199-299.
14. Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado MIL, Matos JA. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. J Ethnopharmacol. 2003; 89: 277-83.
15. Ogunwande IA, Olowore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmid JM, Setzer WN, et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. Int J Aromather. 2005; 15: 147-52.
16. Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, Riley TV. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J Antimicrob Chemother. 1995; 35: 421-4.
17. Nikawa H, Yamasiro H, Egusa H, Furukawa M, Setijato D, Hamada T. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. Mycoses. 2003; 46: 471-8.
18. Baumgartner J, Watts C, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infection of endodontic origin. J Endod. 2000; 26: 695-8.
19. Hannula J, Dogan B, Slots J, Okte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16: 113-8.
20. Martins CAP, Santos SSF, Loberto J, Hoga-Ito CY, Jorge AOC. Presença de *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. Cienc Odontol Bras. 2002; 5: 75-83.
21. Devienne KF, Raddi MSG. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. Braz J Microbiol. 2002; 33: 166-8.
22. Silver L, Bostian K. Screening of natural products for antimicrobial agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990; 9: 455-61.
23. Dutta BK, Karmakar S, Naglot A, Aicha JC, Begam M. Anticandidal activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. Mycoses. 2007; 50: 121-4.
24. Brantner AH, Asres K, Chakraborty A, Tokuda H, Mou XY, Mukainaka T, et al. Grown gall – a plant tumour with biological activities. Phytother Res. 2003; 12: 299-436.
25. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement Altern Med. 2006; 6(39): 1-8.
26. Allegrini J, Bouchberg MS, Mailols H. Émulsion d'huiles essentielles fabrication et applications en microbiologie. Soc Pharm Montpellier. 1973; 33: 73-86.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard. 6th ed. v. 23-M7-A6, 2003.
28. Deswal DP, Chand U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in rice bean (*Vigna umbellata* T.) seeds. Seed Science and Technology. 1997; 25: 409-417.
29. Gabre DF. Manual do teste de tetrazólio. Brasília: AGIPLAN; 1976.
30. Denning DW, Hanson LH, Perlaman AM, Stevens DA. In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents. Diagn Microbiol Infect Dis. 1992; 15: 21-34.

31. Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control. 2004; 15: 479-83.
32. Lemos JA, Costa CR, Araújo CR, Souza LKH, Silva MRR. Susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV⁺ patients to fluconazole, amphotericin B and caspofungin, killing kinetics of caspofungin and amphotericin against fluconazole resistant and susceptible isolates. Braz J Microbiol. 2009; 40: 163-9.
33. Marsh P, Martin MV. Microbiologia oral. São Paulo: Santos; 2005.
34. Nascimento PFF, Rodrigues ARA, Santos PO, Barbosa-Júnior A, Trindade RC. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17: 108-13.
35. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16: 197-201.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Ricardo Dias de Castro

Departamento de Clínica e Odontologia Social, UFPB – Universidade Federal da Paraíba,

58059-900 João Pessoa - PB, Brasil

e-mail: ricardodecastro@yahoo.com.br

Recebido: 17/08/2009

Aceito: 30/06/2010