



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e
Clínica Integrada

ISSN: 1519-0501

apesb@terra.com.br

Universidade Federal da Paraíba
Brasil

de CASTRO, Ricardo Dias; de Oliveira LIMA, Edeltrudes
Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de Candida
Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 11, núm. 3, julio-septiembre, 2011,
pp. 341-345
Universidade Federal da Paraíba
Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63722164006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*

Screening of Essential Oils Antifungal Activity on *Candida* Strains

Ricardo Dias de CASTRO¹, Edeltrudes de Oliveira LIMA²

¹Aluno do Curso de Doutorado Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacologia) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Professor Assistente do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

²Professora Associada do Departamento de Ciências Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

RESUMO

Objetivo: O propósito desse estudo foi identificar a atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida* envolvidas com infecções da cavidade bucal.

Método: Foram avaliados óleos essenciais obtidos a partir das seguintes espécies vegetais: *Citrus reticulata* (Tangerina Cravo); *Citrus aurantifolia* (Limão Tahiti); *Cinnamomum zeylanicum* (Canela); *Matricaria chamomilla* (Camomila Azul); *Mentha piperita* (Menta); *Eugenia uniflora* (Pitanga) e *Zingiber officinale* (Gengibre). A determinação da atividade antifúngica foi realizada utilizando a técnica de difusão em meio de cultura sólido, onde discos de papel de filtro foram embebidos nos óleos e colocados em placas de Petri contendo agar Sabouraud Dextrose inoculado com cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Também foi observada a concentração inibitória mínima a partir do método da microdiluição. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Resultados: Foi observada expressiva atividade antifúngica dos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *C. aurantifolia* e *M. piperita*, que apresentaram diâmetros de halos de inibição de crescimento microbiano de até, respectivamente, 48 mm, 30 mm e 19 mm. Ainda foi possível identificar que 66,7% das cepas ensaiadas mostraram-se resistentes aos óleos essenciais de *C. reticulata*, *M. chamomilla*, *E. uniflora* e *Z. officinale*. O *C. zeylanicum* e nistatina apresentaram, respectivamente, CIMs de 312 µg mL⁻¹ e 32 µg mL⁻¹.

Conclusão: Os óleos essenciais avaliados apresentam atividade antifúngica, sendo os melhores resultados encontrados para *C. zeylanicum*. Sugere-se a realização de outros ensaios para avaliação de atividade anti-*Candida* desse óleo essencial, que pode representar possível agente terapêutico no tratamento de infecções fúngicas da cavidade bucal.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to identify the antifungal activity of essential oils on *Candida* strains involved in oral cavity infections.

Methods: essential oils obtained from the following species were evaluated: *Citrus reticulata* (Cravo Tangerine), *Citrus aurantifolia* (Tahiti Lime), *Cinnamomum zeylanicum* (Cinnamon), *Matricaria chamomilla* (Blue Chamomile), *Mentha piperita* (Mint), *Eugenia uniflora* (Pitanga) and *Zingiber officinale* (Ginger). The determination of antifungal activity was performed using the diffusion technique on solid medium, where filter paper discs were soaked in oils and placed in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar inoculated with strains of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. It was also observed the minimum inhibitory concentration from the microdilution method. Tests were performed in duplicate.

Results: We observed significant antifungal activity of essential oils of *C. zeylanicum*, *C. aurantifolia* and *M. piperita*, which had halos of microbial growth inhibition with diameters up to 48 mm, 30 mm and 19 mm, respectively. Still, it was possible to identify that 66.7% of strains tested were resistant to essential oils of *C. reticulata*, *M. chamomilla*, *E. uniflora* and *Z. officinale*. *C. zeylanicum* and nystatin showed µg mL⁻¹ and 32 µg mL⁻¹ MIC, respectively.

Conclusion: The essential oils tested have antifungal activity, with best results for *C. zeylanicum*. It is suggested to conduct other tests for evaluation of anti-*Candida* activity of this essential oil, which could represent possible therapeutic agent in the treatment of fungal infections of the oral cavity.

DESCRITORES

Candidíase bucal; *Candida*; Plantas Medicinais.

KEY-WORDS

Oral candidiasis; *Candida*; Medicinal Plants.

INTRODUÇÃO

Cepas de *Candida* têm sido associadas às infecções micóticas superficiais e sistêmicas, podendo ser isoladas em até 60% das cavidades bucais, estando a *Candida albicans* e *C. tropicalis* entre as mais prevalentes¹. Tais microrganismos apresentam fatores de virulência envolvidos com a formação de biofilmes, sendo os fatores ambientais (saliva, fluido gengival, pH e nutrientes) favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros microrganismos, incluindo as bactérias envolvidas com as principais patologias da cavidade bucal, cárie dentária e doenças periodontais². Destaca-se que essa habilidade para formação de biofilme está intimamente associada à capacidade de causar infecções, representando um aumento na resistência às drogas antifúngicas e às defesas imunológicas do hospedeiro³⁻⁴.

Mecanismos moleculares envolvidos com a virulência de espécies de *Candida* são elucidados na perspectiva da elaboração de fármacos que apresentem maior especificidade e, conseqüentemente, menos efeitos indesejáveis⁵⁻⁷. Estes mecanismos estão relacionados à ativação da via de transdução de sinal MAP (mitogen-activated protein) Kinase, 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 Kinase⁶.

Atualmente, os agentes disponíveis para tratamento de infecções fúngicas da cavidade oral, caracterizadas como superficiais, são representados pelos poliênicos (anfotericina B, nistatina, entre outros) e azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol, cetoconazol, entre outros), sendo estes últimos os eleitos em primeira instância para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos⁸.

Diante das limitações de uso desses antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microrganismos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tais ocorrências. Nesse sentido, considerando a ampla atividade biológica apresentada pelos produtos de origem natural, óleos essenciais obtidos a partir das espécies vegetais de *Citrus reticulata* (Tangerina Cravo), *Citrus aurantifolia* (Limão Tahiti), *Cinnamomum zeylanicum* (Canela), *Matricaria chamomilla* (Camomila azul), *Mentha piperita* (Menta piperita), *Eugenia uniflora* (Pitanga) e *Zingiber officinale* (Gengibre) têm sido investigados para determinação de suas atividades antimicrobianas⁹⁻¹⁷.

Assim, foi propósito desse estudo avaliar a susceptibilidade de espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente aos óleos essenciais de *Citrus reticulata*, *Citrus aurantifolia*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Matricaria chamomilla*, *Mentha piperita*, *Eugenia uniflora* e *Zingiber officinale*.

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* LM 42V, *C. albicans* 18F, *C. albicans* MD 37, *C. albicans* LM 968, *C. albicans* ICB 12, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. tropicalis* LM 708, *C. tropicalis* LM 759, *C. tropicalis* LM 28, *C. tropicalis* LM14, *C. tropicalis* LM 37 e *C. tropicalis* LM 13.

Os óleos essenciais (Quadro 1) que tiveram a atividade antifúngica avaliada foram obtidos 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.

Quadro 1. Óleos essenciais utilizados no ensaio para determinação da atividade anti-*Candida*.

| Espécie | Família | Nome popular | Densidade g/mL |
|------------------------------|---------------|-----------------|----------------|
| <i>Citrus reticulata</i> | Rutaceae | Tangerina Cravo | 0,844 |
| <i>Citrus aurantifolia</i> | Rutaceae | Limão Tahiti | 0,868 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | Lauraceae | Canela Folha | 1,040 |
| <i>Matricaria chamomilla</i> | Asteraceae | Camomila Azul | 0,916 |
| <i>Mentha piperita</i> | Lamiaceae | Menta Piperita | 0,899 |
| <i>Eugenia uniflora</i> | Myrtaceae | Pitanga | 0,905 |
| <i>Zingiber officinale</i> | Zingiberaceae | Gengibre | 0,970 |

O ensaio para determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi realizado pelo método da difusão em meio sólido¹⁸. Em placas de Petri estéreis foram adicionados 20 mL de agar Sabouraud Dextrose (ASD) fundido e resfriado a 45-50°C. Após solidificação do agar, foi inoculado 1 mL da suspensão fúngica na concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹. Em seguida, discos de papel de filtro estéreis foram embebidos em 50 µL dos óleos essenciais e colocados sobre o meio de cultura.

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

A determinação da CIM para o óleo essencial foi realizada através da técnica da microdiluição, com algumas adaptações, preconizada pelo Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica¹⁹. Para realização desse teste, foram escolhidas as cepas *C. albicans* ATCC 76846 e *C. tropicalis* ATCC 13803. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo Sabouraud dextrose nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, foram distribuídos 100 µL da emulsão do óleo essencial, a uma concentração inicial de 5000 µg mL⁻¹, que foi diluída seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais

correspondente a cada cepa ensaiada na concentração de 10^6 UFC mL⁻¹. Paralelamente, foram realizados controle da viabilidade das cepas de leveduras ensaiadas. Realizou-se também teste de sensibilidade das cepas ensaiadas frente à ação do antifúngico nistatina, considerada droga de escolha na utilização clínica, em concentração inicial de 64 µg mL⁻¹. Para controle de qualidade da metodologia empregada, foi realizado o teste de esterilidade do meio de cultura empregado.

Os ensaios foram realizados em duplicata e incubados a 35°C durante 24-48 horas. A leitura para determinação da CIM dos óleos essenciais sobre as cepas de leveduras foi feita a partir do método visual. Foi levada em consideração a formação ou não de aglomerados de células (“crescimento visual”) 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 microbiológicos¹⁹.

Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foi utilizado o corante TCC (2, 3, 5 trifênil cloreto de tetrazólio) no volume de 10 µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases, envolvidas no processo de respiração. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor²⁰⁻²¹.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados do ensaio para determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais avaliados. Observa-se que todos os óleos essenciais apresentaram efetividade de inibição de pelo menos uma cepa fúngica ensaiada, caracterizada pela formação de halos de inibição de crescimento microbiano igual ou superior a 10 mm. Entre os resultados obtidos, ressalta-se a atividade anti-*Candida* evidenciada pelos óleos essenciais de *C. zeylanicum*, *C. aurantifolia* e *M. piperita*, visto que inibiram o crescimento de todas as cepas ensaiadas (100%). Esta propriedade de inibição pode ser verificada quando observados os diâmetros dos halos de inibição do crescimento das leveduras promovidos pelo *C. zeylanicum*, *C. aurantifolia* e *M. piperita*. Os halos de inibição do crescimento fúngico podem ser observados na Figura 1.

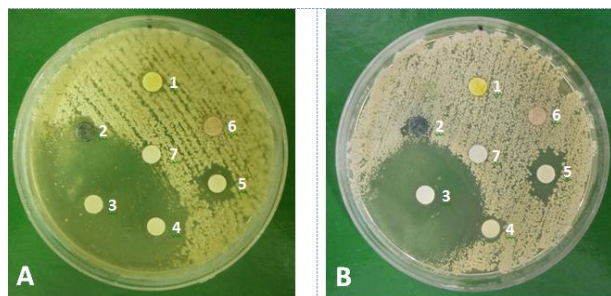


Figura 1. Atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre *C. albicans*

Tabela 1. Medida em milímetro dos halos de inibição de crescimento microbiano produzidos pelos óleos essenciais sobre cepas de *Candida*.

| Cepas | A | B | C | D | E | F | G | H |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <i>C. albicans</i> LM 42V | 0 | 0 | 44 | 18 | 10 | 0 | 0 | 37 |
| <i>C. albicans</i> 18F | 15 | 16 | 48 | 30 | 19 | 10 | 14 | 35 |
| <i>C. albicans</i> MD 37 | 0 | 0 | 40 | 8 | 11 | 0 | 0 | 39 |
| <i>C. albicans</i> LM 968 | 12 | 13 | 40 | 20 | 13 | 0 | 10 | 40 |
| <i>C. albicans</i> ICB-12 | 0 | 0 | 46 | 18 | 13 | 0 | 0 | 42 |
| <i>C. tropicalis</i> LM 708 | 0 | 0 | 38 | 10 | 11 | 0 | 0 | 38 |
| <i>C. tropicalis</i> LM 759 | 0 | 9 | 38 | 14 | 11 | 0 | 0 | 35 |
| <i>C. tropicalis</i> LM 14 | 0 | 0 | 42 | 14 | 11 | 0 | 0 | 38 |
| <i>C. tropicalis</i> LM 28 | 0 | 0 | 40 | 20 | 10 | 0 | 0 | 39 |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 | 10 | 10 | 42 | 17 | 14 | 0 | 9 | 41 |
| <i>C. tropicalis</i> LM37 | 0 | 0 | 40 | 10 | 12 | 0 | 0 | 43 |
| <i>C. tropicalis</i> LM 13 | 10 | 12 | 42 | 22 | 13 | 0 | 11 | 43 |

A – *Citrus reticulata* (Tangerina Cravo), B – *Matricaria chamomilla* (Camomila), C – *Cinnamomum zeylanicum* (Canela folha), D – *Citrus aurantifolia* (Limão Tahiti), E – *Mentha piperita* (Menta piperita), F – *Eugenia uniflora* (Pitanga) e G – *Zingiber officinale* (Gengibre)

Por outro lado, 66,7% das cepas ensaiadas mostraram-se resistentes aos óleos essenciais de *C. reticulata*, *M. chamomilla*, *E. uniflora* e *Z. officinale*, estando as cepas de *C. tropicalis* LM 708 e *C. tropicalis* LM 759 entre as mais resistentes. Considerando que óleo essencial de *C. zeylanicum* apresentou os melhores resultados no teste de difusão em meio sólido, foi verificada a menor concentração desse produto capaz de inibir o crescimento fúngico. Assim, foi observada CIM de 312,5 µg mL⁻¹ sobre as cepas de *C. albicans* ATCC 76845 e *C. tropicalis* ATCC 13803. Por sua vez, a nistatina apresentou uma CIM de 32 µg mL⁻¹ sobre as mesmas cepas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima do Óleo essencial de *C. zeylanicum* e Nistatina sobre cepas de *Candida*.

| Cepas | CIM (µg mL ⁻¹) <i>C. zeylanicum</i> | CIM (µg mL ⁻¹) Nistatina |
|---------------------------------|--|---|
| <i>C. albicans</i> ATCC 76845 | 312,5 µg/mL | 32 µg/mL |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 | 312,5 µg/mL | 32 µg/mL |

DISCUSSÃO

Os resultados apontam que os óleos essenciais

expressiva atividade anti-*Candida* evidenciada pelo óleo essencial de *C. zeylanicum*, que promoveu a formação de halos de inibição de crescimento de até 48 mm sobre as cepas ensaiadas. Resultado semelhante foi apontado por outro estudo²³, onde foi encontrado halo de inibição superior a 40 mm quando da avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico da *C. zeylanicum* sobre cepas de *C. albicans*. Esta expressiva atividade antifúngica da *C. zeylanicum* também foi encontrada sobre espécies de *Aspergillus*, sendo encontrados halos de inibição de crescimento de até 19 mm¹⁴.

As cepas fúngicas também apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de *C. aurantifolia*, sendo encontrados halos de inibição de crescimento de até 30 mm para *C. albicans* 18F. Estes resultados são semelhantes aos achados de literatura²⁴, que evidenciaram que cepas de *Candida* são sensíveis ao óleo em concentrações de até 256 mg/mL.

O óleo essencial obtido a partir da *M. piperita* apresentou atividade sobre todas as cepas ensaiadas, com halos de inibição de crescimento de até 19 mm. Entretanto, não foi observada na literatura atividade anti-*Candida* do extrato etanólico obtido a partir dessa espécie vegetal²⁵.

A fraca atividade antifúngica evidenciada pelos outros óleos essenciais avaliados (*C. reticulata*, *M. chamomilla*, *E. uniflora* e *Z. officinale*) também tem sido evidenciada por outros estudos^{9,11,15,17,26}.

Destaca-se que a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais apresenta algumas dificuldades, que estão associadas às características químicas dos mesmos, como: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, que podem interferir significativamente nos resultados²². Por outro lado, a hidrofobicidade apresentada pelos óleos essenciais pode facilitar sua interação com estruturas celulares que tem constituição lipídica, promovendo aumento da permeabilidade, provocando uma saída extensiva de eletrólitos, indispensáveis à sobrevivência celular²⁷.

Assim, deve-se reconhecer que os óleos essenciais obtidos a partir de plantas são considerados fontes promissoras para elaboração de fármacos utilizados no tratamento de micoses, mesmo considerando que os fungos envolvidos em infecções humanas apresentam-se relativamente mais sensíveis aos antifúngicos sintéticos comerciais²⁸⁻²⁹. Porém, considerando a necessidade de ampliação do arsenal terapêutica antifúngico, devido, principalmente, ao aumento do número de cepas resistentes aos produtos comercialmente disponíveis, a busca por novos compostos antifúngicos mostra-se de relevante significância¹⁵.

Ressalta-se que este estudo representa uma avaliação inicial para determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de outros ensaios pré-clínicos, que incluem a determinação de concentrações fungicida e fungistática, avaliação da curva de morte microbiana, além do desenvolvimento de estudos sobre o possível mecanismo de ação e propriedades

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar o potencial antifúngico dos produtos naturais avaliados, destacando o expressivo resultado apresentado pelos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) e *Citrus aurantifolia* (Limão Tahiti), representando uma possível aplicação desses produtos na prevenção e tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica, incluindo a candidose oral.

REFERÊNCIAS

1. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res* 2004; 38(1):204-211.
2. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2006; 51(1):672-680.
3. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Biointerfaces* 2004; 33(1):235-241.
4. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lo'pez-Ribot JL. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryot Cell* 2005; 4(4):633-638.
5. Orozco AS, Zhou X, Filler SG. Mechanisms of the Proinflammatory Response of Endothelial Cells to *Candida albicans* Infection. *Infect Immun* 2000; 68(3):1134-1141.
6. Monge RA, Roma'n E, Nombela C, Pla J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* 2006; 152(1):905-912.
7. 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(1): 8435-8445.
8. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(3): 272-276.
9. Jantan IB, Moharam BAK, Santhanam J, Jamal JA. Correlation between chemical composition and antifungal activity of the essential oils of eight *Cinnamomum* species. *Pharmaceutical Biology* 2008; 46(6):405-412.
10. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 2008; 19(1):1130-1138.
11. Konning GH, Agyare C, Ennison B. Antimicrobial activity of some medicinal plants of Ghana. *Fitoterapia* 2004; 75(1):65-67.
12. Bonjar GH, Aghighi S, Karimi Nik A. Antibacterial and antifungal survey in plant used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. *J Bio Sci* 2004; 4(3):405-412.
13. Srinivasan D, Sangeetha N, Suresh T, Lakshmana P. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacology* 2001; 74(1):217-220.
14. Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *WJMS* 2008; 3(2):81-88.
15. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO; Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de

16. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res* 2006; 20(1):58-61.
17. Wilson CL, Solar JM, Ghaouth AE. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Bortrytis cinerea*. *Plant Dis* 1997; 81(2):204-210.
18. Bauer AWMM, Kirby JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(3):493-496.
19. National Committee For Clinical Laboratory Standard. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada – M27-A2, 2.ed., v. 23, n.15, 2002.
20. Deswal DP, Chand U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* T.) seeds. *Seed Sci Technol* 1997; 25(1):409-17.
21. Gabre DF. Manual do teste de tetrazólio. Brasília: Agiplan, 1976. 85p.
22. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31(1):247-256.
23. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Manazir AS, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 2008; 13(1):1-12.
24. Aibinu I, Adenipekun T, Adelowotan T, Ogunsanya T, Odugbemi T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *Afr J Trad* 2007; 4(2):185-195.
25. Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacology* 2005; 97(2):305-311.
26. Onyeagba RA, Ugbohu OC, Okeke CU. Studies on the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus auratifolia* Linn). *Afr J Biotechnol* 2004; 3(10):552-554.
27. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6(39):1-8.
28. Faleiro ML, Miguel MG, Ladeiro F, Venâncio F, Britto JC, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett Appl Microb* 2003; 29(1):130-135.
29. Shin S, Pyun M. Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytother Res* 2004; 18(1):827-830.

Recebido/Received: 18/06/2010

Revisado/Reviewed: 04/02/2011

Aprovado/Approved: 27/05/2011

Correspondência:

Ricardo Dias de Castro

Departamento de Clínica e Odontologia Social. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, Campus Universitário I, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba. CEP: 58059-900.

Telefone: (83) 9317-1071

E-mail: ricardodiasdecastro@yahoo.com.br