

Atividade Antifúngica e Alterações Morfológicas Induzidas pelo Óleo Essencial de *Cinnamomum cassia* frente Cepas de *Candida albicans* Isoladas de Pacientes HIV Positivos

Antifungal Activity and Morphological alterations Induced by *Cinnamomum cassia* Essential Oil against *Candida albicans* Strains Isolated from HIV-positive Patients

Leopoldina de Fátima Dantas de ALMEIDA¹, Yuri Wanderley CAVALCANTI², Ricardo Dias de CASTRO³, Edeltrudes de Oliveira LIMA⁴

¹Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontologia Preventiva Infantil - Mestrado) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

²Aluno do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

³Professor do Departamento de Clínica e Odontologia Social. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa/PB, Brasil.

⁴Professora Doutora do Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade antifúngica, o efeito sobre a cinética de morte microbiana e as alterações morfológicas do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela) sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e cepa padrão (ATCC 76485).

Método: Suspensões fúngicas (10^6 UFC/mL) foram preparadas a partir de amostras clínicas (n=15) e padrão (n=1) de *C. albicans*. Emulsões do óleo essencial foram avaliadas em concentrações que variaram entre 1024 µg/mL e 4 µg/mL. A ação antifúngica foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica da microdiluição. Realizou-se o ensaio de cinética sobre a morte das leveduras (tempos 0, 30, 60, 180 minutos e 24h), bem como a avaliação da interferência do óleo essencial sobre a micromorfologia das cepas. O miconazol (50 µg/mL) foi utilizado como controle e a análise estatística se deu pelos testes Kruska-Wallis e Dunn ($p < 0,05$).

Resultados: A CIM variou entre 64 e 128 µg/mL, frente às cepas testadas. Para o teste de cinética, verificou-se ação antifúngica de *C. cassia* nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM, em todos os tempos analisados. O controle de crescimento foi estatisticamente diferente do miconazol e do óleo essencial ($p < 0,01$), não sendo observada diferença estatística entre o efeito do miconazol e do produto natural ($p > 0,05$). Alterações na micromorfologia das cepas (ausência de pseudohifas e clamidoconídeos) foram verificadas na CIM.

Conclusão: O óleo essencial de *C. cassia*, semelhante ao miconazol, apresentou atividade antifúngica e efeito sobre a cinética de morte microbiana. Os produtos avaliados provocaram alterações sobre a micromorfologia das cepas testadas.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antifungal activity, the effect on microbial death kinetics and the morphological alterations caused by *Cinnamomum cassia* (canela) essential oil against *Candida albicans* strains isolated from HIV-positive patients and a reference strain (ATCC 76485).

Method: Fungal suspensions (10^6 CFU/mL) were prepared from clinical (n=15) and reference (n=1) *C. albicans* samples. Essential oil emulsions were evaluated at concentrations between 1024 µg/mL and 4 µg/mL. The antifungal action was determined by the minimal inhibitory concentration (MIC) using the microdilution technique. The kinetics assay for yeast death was performed (times: 0, 30, 60, 180 minutes and 24 h) as well as evaluation of the interference of the essential oil on the micromorphology of the strains. Miconazol (50 µg/mL) was used as a control. The statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$).

Results: The MIC varied from 64 to 128 µg/mL for the tested strains. The kinetics assay revealed antifungal action of the *C. cassia* at the concentrations MIC, 2xMIC and 4xMIC, at all analyzed times. Growth control was significantly different for miconazol and for the essential oil ($p < 0.01$), with no statistically significant difference between the effect of miconazol and the natural product ($p > 0.05$). Alterations in the micromorphology of the strains (absence of pseudohifas and chlamydoconidias) were verified in the MIC.

Conclusion: In the same way as miconazol, *C. cassia* essential oil presented antifungal activity and effect on microbial death kinetics. The tested products caused alterations on the micromorphology of the tested strains.

DESCRITORES

Candida albicans; Candidíase Bucal; Produtos Biológicos.

KEY-WORDS

Candida albicans; Oral Candidiasis; Biological Products.

INTRODUÇÃO

As espécies fúngicas do gênero *Candida* coexistem com a comunidade bacteriana da microbiota oral normal, sendo verificado que o isolamento de *Candida* spp. da cavidade bucal não implica, necessariamente, na ocorrência de infecções, já que tal fato é observado em indivíduos saudáveis¹. Entretanto, por representarem um grupo de microrganismos oportunistas, podem causar infecções diagnosticadas como candidoses^{2,3}.

Além dos fatores inerentes à cavidade bucal, a imunossupressão é um fator condicionante para o aparecimento de candidose oral. Essa infecção é comum em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), sendo a *C. albicans* reconhecida como um marcador biológico da evolução da doença⁴.

Aproximadamente 81% dos pacientes com AIDS são colonizados por cepas de *Candida*⁵. O isolamento de *C. albicans* da cavidade bucal de pacientes portadores de AIDS tem sido comum⁶⁻⁸, permitindo observar que algumas amostras são resistentes aos antifúngicos utilizados no tratamento da doença⁶.

Para o tratamento da candidose oral, a conduta clínica tem levado ao uso de antifúngicos sintéticos, representados pela Anfotericina B e Nistatina, bem como os derivados azólicos (miconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol)³. Porém, o amplo uso destes agentes tem chamado atenção para o desenvolvimento de espécies resistentes⁹. A literatura relata casos de resistência medicamentosa de *C. albicans* frente a derivados azólicos, em pacientes HIV positivos com diagnóstico de candidose oral¹⁰. Assim, diante do evidente crescimento do número de patógenos resistentes aos antimicrobianos atualmente utilizados na clínica, existe uma clara e emergente necessidade de introduzir novos compostos antimicrobianos no arsenal terapêutico¹¹.

A utilização de produtos de origem natural tem sido uma opção estudada, visando obter substâncias de capacidade antifúngica comprovada, aliada a menor resistência esperada das espécies fúngicas. Diante disto, alguns estudos avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana de produtos naturais à base de *Cinnamomum cassia* (canela da china)¹²⁻¹⁴.

Assim, o propósito deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (*C. cassia*) e seu efeito sobre a cinética de morte microbiana e micromorfologia de cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e cepa padrão.

METODOLOGIA

Óleo essencial

O óleo essencial de *C. cassia* foi adquirido mediante compra na Empresa Laszlo Aromaterapia LTDA® (Santa Catarina). De acordo com o laudo técnico fornecido pelo fabricante, o nome popular do espécime é

canela da china. Segundo o mesmo laudo, utilizou-se a casca para extração do óleo essencial, obtido pelo método da destilação e arraste a vapor. O Quadro 1 apresenta a composição química informada do produto.

Quadro 1. Composição química informada do óleo essencial de *C. cassia*, segundo especificação do fornecedor (João Pessoa, 2011).

Constituinte	%
Aldeído Cinâmico	83,9
α-pineno	1,2
Canfeno	0,4
p-cimeno	0,5
Eugenol	0,4
β-cariofileno	0,2
Benzoato de benzila	6,8

Amostras Fúngicas

No presente estudo, foram utilizadas 15 amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos, cedidas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. Para tal finalidade, foi assinado um termo de anuência, para concessão das referidas amostras e utilização do espaço físico do laboratório. As amostras foram nomeadas aleatoriamente por códigos C-01 a C-15. Utilizou-se uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 76485), identificada pelo código CP.

Devido à utilização de amostras clínicas de *C. albicans*, o presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley, de acordo com a resolução 196/96. A aprovação pelo respectivo órgão foi registrada segundo parecer n°.462/10, folha de rosto n°363362.

As amostras foram devidamente isoladas e estocadas em agar Sabouraud Dextrose (ASD), em ambiente refrigerado. Para o ensaio laboratorial foram confeccionadas suspensões fúngicas em solução salina estéril a 0,9%, contendo aproximadamente 10⁶ UFC/mL, padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland.

Diluição do Óleo Essencial de *C. cassia*

Para a realização dos ensaios microbiológicos, proferiu-se diluição do óleo essencial de *C. cassia*¹⁵. A emulsão foi mantida sob agitação em Vortex, sendo a concentração inicial obtida de 2048 µg/mL.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Para determinação da CIM, utilizou-se a técnica da microdiluição em caldo Sabouraud Dextrose¹⁶. Inicialmente, distribuiu-se 100 µL de caldo Sabouraud Dextrose (DIFICO®, Detroit, Michigan, EUA) (CSD) duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição de 96 orifícios. Em seguida, 100 µL da emulsão do óleo essencial de *C. cassia* foi distribuída realizando-se diluições a partir da transferência de alíquotas de 100 µL da cavidade mais concentrada para a

cavidade sucessora. Desta forma as concentrações variaram entre 1024 µg/mL e 4µg/mL, totalizando nove diluições seriadas. Nos orifícios de cada coluna foram dispensadas alíquotas de 10 µL das suspensões fúngicas de *C. albicans*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 35-37°C.

Para validação do teste foram realizados o controle de viabilidade das cepas ensaiadas, teste de esterilidade do meio de cultura e controle das cepas com antifúngico miconazol (considerado fármaco padrão), na concentração 50 µg/mL. A determinação da CIM foi observada mediante teste visual, observando-se a presença ou não de aglomerados de células (crescimento visual) no fundo das cavidades da placa. Assim, a foi considerada CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de produzir inibição visível (ausência de aglomerados celulares) do crescimento das cepas de *C. albicans*¹⁶. A análise dos dados para determinação da CIM se deu de forma descritiva.

Efeito sobre a cinética de morte das leveduras

O estudo da interferência do óleo essencial de *C. cassia* sobre a cinética de morte microbiana foi realizado por meio da técnica de contagem de células viáveis para os fungos leveduriformes. Neste ensaio, observou-se o comportamento das cepas frente à CIM determinada pelo método de microdiluição, além das concentrações 2xCIM e 4xCIM. Para a execução do ensaio de cinética foi selecionada uma amostra clínica (C-02) e a amostra padrão (CP) de *C. albicans*.

Emulsões (500 µL) do óleo essencial de *C. cassia*, preparadas nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM, foram adicionados em tubos de ensaio contendo 4 mL de CSD estéril e 500 µL das suspensões das leveduras (10⁶ UFC/mL). Os respectivos tubos foram incubados a 35-37°C por 24 horas, no decorrer do ensaio. Nos tempos determinados (0, 30, 60, 120min e 24 horas), uma alíquota de 10 µL das soluções testes foi inoculada sobre em placas de ASD para determinação da contagem de colônias. As placas inoculadas foram incubadas a 35-37°C durante 24 horas, sendo os testes realizados em triplicata.

De forma equivalente, realizou-se o ensaio de cinética para o miconazol, fármaco padrão escolhido para o referido teste. Assim, o comportamento das cepas foi avaliado utilizando-se as concentrações de 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, pois nos ensaios anteriores o antifúngico padrão foi utilizado em uma concentração fixa, não tendo sido realizada a determinação da CIM, já que o mesmo apresenta-se para uso clínico. No mesmo experimento, foi realizado o grupo para controle de crescimento, utilizando-se água destilada estéril em substituição do agente antifúngico.

Após o período de incubação, determinou-se o total de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) para cada tempo, concentração e cepa testadas. Verificou-se a relação entre a concentração testada, o tempo de exposição às soluções antifúngicas e a média de crescimento de cada cepa avaliada. Assim,

comparou-se a dimensão da atividade antifúngica em várias concentrações, diante dos tempos avaliados, comparando-se o grupo teste com o fármaco sintético e o controle de crescimento.

Os dados coletados (total de UFC/mL em função do tempo e concentração analisados) foram considerados não paramétricos, visto que são variáveis discretas e não podem apresentar distribuição normal. Assim, a análise estatística se deu pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%.

Efeito sobre a morfologia das leveduras

A técnica do microcultivo para leveduras foi empregada na determinação do efeito sobre a morfologia das amostras de *C. albicans*, utilizando-se o meio sólido ágar-arroz em câmara úmida¹⁷. Para tal teste, selecionou-se uma amostra clínica (C-02) e a padrão (CP).

Ao meio de cultura ágar-arroz, foram dispensadas as emulsões do óleo essencial nas concentrações correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM. O controle de crescimento foi realizado com água destilada estéril e o miconazol (padrão farmacológico) foi avaliado nas concentrações: 50, 100 e 200 µg/mL. Assim, foram formados sete sistemas-testes, em tubos de ensaio estéreis.

Em seguida, transferiu-se 1 mL do ágar-arroz associado aos produtos testes para uma lâmina de vidro, formando uma camada delgada. Após a solidificação do ágar-arroz, semeou-se a levedura com o auxílio de alça bacteriológica em forma de agulha, fazendo uma estria paralela. Adicionou-se uma lamínula de vidro, para cobrir o microcultivo e inseriu-se o sistema em placa de petri estéril. Posteriormente, 1 mL de água destilada e esterilizada foi inserida na placa de petri, para manter a umidade. Cada placa foi fechada e incubada a temperatura de 35-37°C durante 48 horas.

Decorrido o tempo de incubação, cada preparação foi examinada em microscopia de campo claro para a observação da formação ou não das estruturas características das leveduras, incluindo blastoconídeos, pseudohifas, e clamidoconídeos. Os microcultivos foram fotografados e caracterizados de acordo com a presença das estruturas leveduriformes, as quais se encontravam presentes, ausentes ou raros.

RESULTADOS

A CIM do óleo essencial de *C. cassia*, frente às cepas clínicas e padrão variou entre 128 e 64 µg/mL (Quadro 2). O miconazol, avaliado na concentração 50 µg/mL, inibiu a atividade de todas as cepas testadas.

Em relação ao efeito do óleo essencial de *C. cassia* sobre a cinética de morte de *C. albicans* (C-02 e CP), verificou-se que os produtos testados produziram redução significativa do total de UFC/mL, quando comparados ao controle de crescimento. A Tabela 1 apresenta as médias do total de Unidades Formadoras de

Colônia por mililitro (UFC/mL x 10⁴) de cada cepa testada, após exposição aos produtos analisados nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (p>0,05) entre a atividade do óleo essencial e do miconazol, nas concentrações testadas, sendo ambos estatisticamente diferentes (p<0,01) do controle de crescimento.

Quadro 2. Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) do óleo essencial de *C. cassia* frente às amostras de *C. albicans*.

Amostra	CIM
C-01	64
C-02	64
C-03	64
C-04	64
C-05	64
C-06	64
C-07	64
C-08	64
C-09	64
C-10	64
C-11	64
C-12	128
C-13	64
C-14	64
C-15	64
CP	64

Tabela 1. Média do total de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL x 10⁴) de cada cepa testada, após exposição aos produtos analisados nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM.

Produtos testados	Amostras de <i>C. albicans</i>	
	C-02	CP
Controle (água destilada)	26,7 ^a	49,5 ^a
<i>C. cassia</i> CIM	9,2 ^b	19,4 ^b
<i>C. cassia</i> 2xCIM	8,6 ^b	17,3 ^b
<i>C. cassia</i> 4xCIM	9,2 ^b	18,3 ^b
Miconazol CIM	12,7 ^b	18,8 ^b
Miconazol 2xCIM	11,4 ^b	15,1 ^b
Miconazol 4xCIM	6,7 ^b	12,9 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,01) – Testes Kruskal-Wallis e Dunn.

A Figura 1 ilustra o efeito das concentrações do Miconazol e do óleo essencial (OE) frente à cepa C-02, em todos os tempos de avaliação. Observou-se diferença estatisticamente significativa (p< 0,01) entre os grupos teste e o controle de crescimento.

A Figura 2 ilustra o efeito das concentrações do Miconazol e do óleo essencial (OE) frente à cepa padrão CP, em todos os tempos de avaliação. Observou-se diferença estatisticamente significativa (p< 0,01) entre os grupos teste e o controle de crescimento.

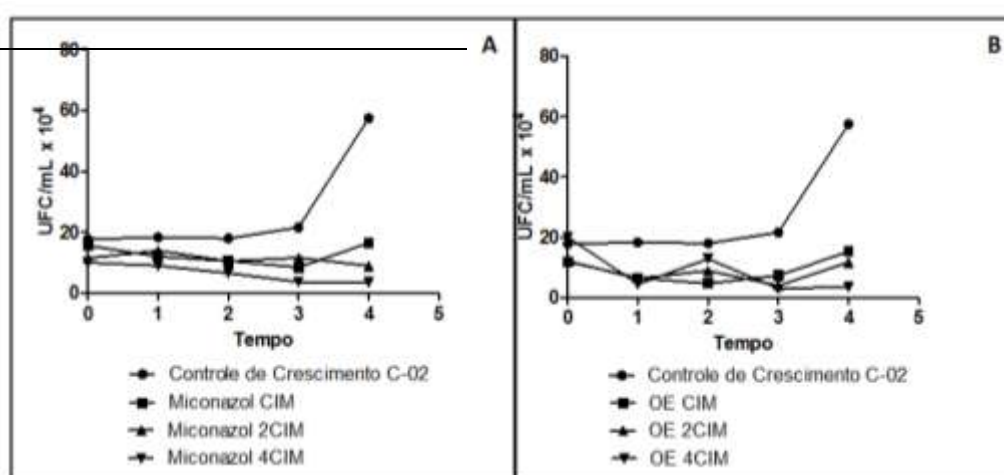


Figura 1. Curva de morte microbiana obtida para a atividade antifúngica do Miconazol (A) óleo essencial de *C. cassia* – OE (B) nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM sobre a cepa clínica de *C. albicans* (C-02), nos tempos 0, 30, 60, 120 minutos e 24 horas. Observou-se diferença estatisticamente significativa (p<0,01) entre o total de UFC/mL obtidos para o controle e para os grupos teste.

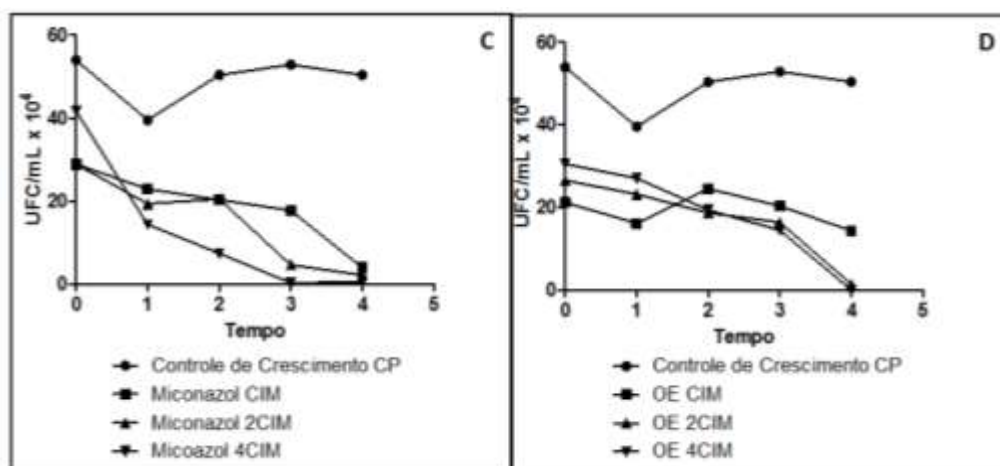


Figura 2. Curva de morte microbiana obtida para a atividade antifúngica do Miconazol (C) óleo essencial de *C. cassia* – OE (D) nas concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM sobre a cepa padrão de *C. albicans* (CP), nos tempos 0, 30, 60, 120 minutos e 24 horas. Observou-se diferença estatisticamente significativa (p<0,01) entre o total de UFC/mL obtidos para o controle e para os grupos teste.

Em relação à interferência do óleo essencial sobre a micromorfologia fúngica, por meio da análise em microscopia de campo claro, foi verificada a presença de blastoconídios em todas as lâminas analisadas. Entretanto, a presença de pseudohifas foi considerada ausente, em todas as concentrações do grupo teste bem como comparadas ao miconazol. A presença de clamidoconídios foi considerada rara nos grupos analisados (Figuras 3 e 4).

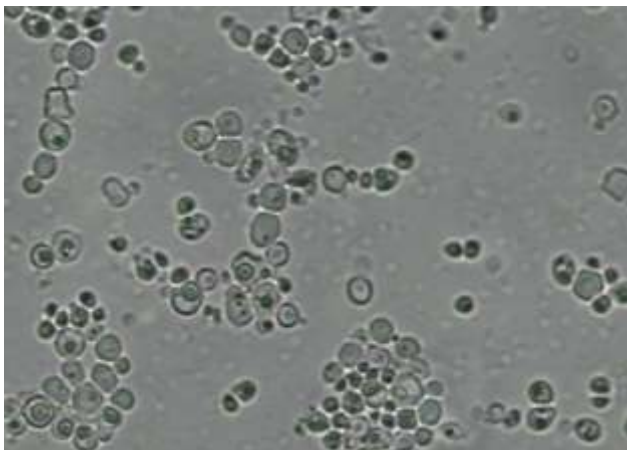


Figura 3. Micromorfologia da cepa clínica C-02 de *C. albicans* frente ao uso do óleo essencial na CIM. Observa-se presença de raros clamidoconídios e ausência de pseudohifas.

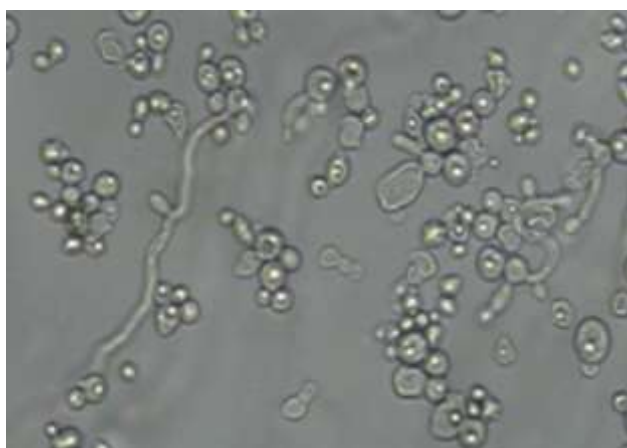


Figura 4. Micromorfologia da cepa clínica C-02 de *C. albicans* sob ação do Miconazol, observando-se a presença de pseudohifas e clamidoconídios.

DISCUSSÃO

A atividade antifúngica do óleo essencial de *C. cassia* foi avaliada por métodos distintos, inicialmente por microdiluição em caldo, no qual foram verificados os valores de CIM entre 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$, sendo para 93,75% (n=15) a CIM igual a 64 $\mu\text{g/mL}$, inclusive a CP. O produto foi caracterizado como eficiente agente antifúngico, já que apresentou atividade antifúngica superior a 0,5mg/mL¹⁸. Outras investigações avaliaram a CIM do óleo essencial de *C. cassia* frente a *C. albicans* (ATCC 90029), obtendo-se como valor para CIM 0,169 $\mu\text{L/mL}$ ¹². Ressalta-se que as diferenças encontradas nos valores de

CIM podem ser caracterizadas devido à utilização de espécies fenotipicamente diferentes de *C. albicans*.

A ação antimicrobiana do óleo essencial de *C. cassia* foi testada frente espécies bacterianas como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, sendo a CIM do óleo determinada nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,001mg/mL, respectivamente¹⁴. Desta forma, mesmo sendo estabelecida comparação entre espécies fúngicas e bacterianas, considerando suas diferenças estruturais como parede celular e metabolismo, constata-se atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. cassia*.

A composição química do óleo essencial de *C. cassia* pode explicar sua atividade antimicrobiana, devido à presença do cinomaldeído (83,9%) e eugenol (0,4%), conhecidos por sua atividade antifúngica. A atividade antifúngica do referido óleo foi constatada pela literatura, frente a inibição do crescimento de hifas e esporos de *A. niger*¹³. Observou-se que o óleo essencial, comparado a outras 74 amostras de óleos essenciais teve o melhor desempenho, relacionando-se os valores de halos de inibição das amostras, sendo inferior apenas ao óleo essencial de *C. zeylanicum*¹³.

A atividade antifúngica do óleo essencial foi comprovada diante da determinação da CIM, bem como por meio da atividade sobre a cinética de inibição das leveduras. Observou-se que a CIM foi capaz de diminuir o crescimento das leveduras, sendo este efeito diretamente proporcional à concentração do óleo essencial. Dessa forma, demonstra-se que, para o ensaio de cinética, quanto maior a concentração do óleo essencial maior a atividade antifúngica. Sugere-se que estudos futuros possam comparar os possíveis mecanismos de ação do óleo essencial, sabendo-se que, devido ao seu caráter hidrofóbico, permitem interação com estruturas lipídicas, aumentando a permeabilidade celular, provocando danos irreversíveis à célula^{19,20}.

O gênero *Candida* é caracterizado por apresentar fungos leveduriformes, tendo em sua reprodução assexuada a formação de blastoconídios, clamidoconídios e pseudo-hifas²¹. Estas estruturas são determinadas como estruturas de virulência deste gênero.

Estudos sobre as alterações morfológicas provocadas por óleos essenciais na micromorfologia fúngica ainda são escassos. Entretanto, observou-se que o óleo essencial de *C. cassia* foi eficiente na diminuição dos fatores de virulência da *C. albicans* de origem clínica e padrão. Da mesma forma que o ensaio de cinética, a atividade do óleo inibiu o crescimento de pseudohifas e clamidoconídios, considerando-se a o efeito de inibição diretamente proporcional à concentração.

Sabe-se que a resistência aos produtos antifúngicos se deve a fatores do próprio paciente e sua interação com o patógeno e o medicamento; entretanto pode-se considerar a resistência *in vitro* e *in vivo*. A resistência *in vitro* pode ser observada a partir da interação entre o microrganismo e o fármaco, sendo verificadas transformações na morfologia microbiana, as quais levarão à resistência. A resistência *in vivo* pode estar relacionada ao teor do fármaco presente na

corrente sanguínea e a ineficácia do medicamento²². O presente estudo confronta a utilização do óleo essencial de *C. cassia* frente a cepas de origem padrão e clínica, de *C. albicans*, constatando que não há diferenças na resistência destes microrganismos ao uso do produto.

A realização de estudos mais específicos, como a atividade antifúngica sobre biofilme multiespécie de *Candida*, o qual engloba espécies com genótipos e fenótipos diferentes devem ser realizados a fim de determinar o comportamento do óleo essencial frente a outros microrganismos. Aliado a este estudo, outros devem ser realizados buscando o isolamento do princípio ativo do óleo essencial e assim formar suposições a cerca do mecanismo de ação do óleo essencial.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o óleo essencial de *C. cassia*, semelhante ao miconazol, apresentou atividade antifúngica e efeito sobre a cinética de morte microbiana, sendo observadas alterações na micromorfologia das cepas testadas.

REFERÊNCIAS

1. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):398-429.
2. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *An Bras Dermatol* 2004; 79(6):689-97.
3. Kuriyama, T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(6):349-53.
4. Corrêa EM, Andrade ED. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. *Rev Odonto Cienc* 2006; 20(49):281-9.
5. Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93(2):155-60.
6. Magliorati CM, Birman EG, Cury AM. Oropharyngeal candidiasis in HIV -infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(3):301-10.
7. Gutiérrez C, Bedout C, Tobón AM, Cano LE, Arango M, Tabares AM, et al. Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de aislamientos de *Candida* spp., obtenidos de mucosa oral de pacientes com sida. *Infectio* 2007; 11(4):183-9.
8. Gabler IG, Barbosa AC, Velela RR, Lyon S, Rosa CA. Incidence and anatomic localization of oral Candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. *J Appl Oral Sci* 2008; 16(4):247-50.
9. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among clinical isolates of *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3137-41.
10. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG, Pappas PG, Dismukes WE, et al. Practice Guidelines for the treatment of candidiasis. *J Infect Dis* 2000; 30(4):662-78.
11. Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad AA, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 2009; 14(2):586-97.
12. 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.
13. Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 2006; 49(4):316-23.
14. Carvalho TM, Tosta TF, Sarmento RR, Beghini ML, Okura MH. Verification of the antibacterial activity in vitro of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* and *Rosmarinus officinalis* in bacteria which cause infections of the urinary tract. *Rev Bras Anal Clin* 2010; 42(3):213-5.
15. Ellof JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 1998; 64(8):711-3.
16. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. *Rev Bras Pl Med* 2011; 13(2): 203-8.
17. Gungi S, Arima K, Beppu T. Screening of antifungal to inducing morfological abnormalities. *Agric Biol Chem* 1983; 47(9): 2061-9.
18. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem* 2001; 49(9):4168-70.
19. Nascimento PFC, Nascimento ALC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa-Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17(1):108-13.
20. Cavalcanti YW, Almeida LDF, Padilha WWN. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. *Rev Odonto Cienc* 2011; 26(2):139-44.
21. Sidrim JJC, Rocha MFG. Candidíase. In: Sidrim JJC, Rocha MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2004; 265-73.
22. Silva V, Díaz MC, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Rev Chil Infectol* 2002; 19(2):149-56.

Recebido/Received: 26/10/2011

Revisado/Reviewed: 19/04/2012

Aprovado/Approved: 06/07/2012

Correspondência:

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida
Rua Luiz Germóglgio, 439, apt. 304 – Bancários
João Pessoa – Paraíba - Brasil
Email: leopoldinalmeida@hotmail.com