

Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos

[Antifungal activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* on *Candida tropicalis* strains from clinical isolates]

Juliana MOURA MENDES¹, Felipe Queiroga SARMENTO GUERRA¹, Fillipe de OLIVEIRA PEREIRA¹,
Janiere PEREIRA de SOUSA¹, Vinicius NOGUEIRA TRAJANO¹ & Edeltrudes de OLIVEIRA LIMA¹

Laboratory of Mycology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-970, João Pessoa - PB, Brazil.
Contactos / Contacts: Juliana MOURA MENDES - E-mail address: julianammfarma@hotmail.com

Abstract

Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by *Candida* yeasts. In Brazil, *C. tropicalis* is the second most frequently isolated microorganism after *C. albicans*. The arising of strains resistant to conventional antifungal agents has increased the search for new alternatives from natural products, especially essential oils. This research investigated essential oil activity against strains of *C. tropicalis* by disk diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were also determinate. In the disk diffusion, the essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* and *Origanum vulgare* had the highest inhibition zones values. MIC and MFC values of *E. caryophyllata* essential oil were 512 and 1024 µg/mL, respectively. MIC and MFC amphotericin B values were identical (2 µg/mL). Therefore, it was concluded that *E. caryophyllata* essential oil has strong antifungal activity and may be subject to further studies.

Keywords: Candidiasis, *Candida tropicalis*, clove, clinical isolates, strong activity, essential oil, antifungal activity

Resumen

La candidiasis es una infección fúngica oportunista causada por levaduras del género *Candida*. En Brasil, la especie *C. tropicalis* esta siendo aislada frecuentemente, es el segundo microorganismo más aislado después de *C. albicans*. La aparición de cepas resistentes a los antifúngicos convencionales ha aumentado la búsqueda de nuevas alternativas provenientes de productos naturales, especialmente los aceites esenciales. En este estudio se investigó la actividad de los aceites esenciales contra las cepas de *C. tropicalis*, utilizando el método de difusión en disco, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM). En el método de difusión en disco, con los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* y *Origanum vulgare* se obtuvieron mayores valores de inhibición. La CIM y CFM del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fueron 512 y 1024 µg/mL, mientras que los de la anfotericina B fueron idénticos, 2 µg/mL. Por lo tanto, se puede concluir que el aceite esencial de *E. caryophyllata* tiene potente actividad antifúngica y puede ser objeto de nuevos estudios sobre esta actividad.

Palabras Clave: Candidiasis, *Candida tropicalis*, clavo de la India, Aislado clínico, aceite esencial, actividad antifúngica

Recibido | Received: 23 de Diciembre de 2011.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 6 de Febrero de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2012.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Los autores agradecen el apoyo financiero de la UFPB, CAPES y CNPq (Brazil).

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Juliana Moura Mendes, Felipe Queiroga Guerra, Fillipe de Oliveira Pereira, Janiere Pereira de Sousa, Vinicius Nogueira Trajano, Edeltrudes de Oliveira Lima. 2012. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 11(3): 208 – 217.

INTRODUCCIÓN

Levaduras del género *Candida* están frecuentemente presentes en humanos de forma comensal, especialmente en la composición de la microbiota normal de la piel y de mucosas, como en la cavidad bucal, en tractos gastrointestinales y en la vagina, estando en equilibrio con la microbiota normal y con el sistema inmune del hospedero (Wroblewska *et al.*, 2002; Schofield *et al.*, 2003; Tavanti *et al.*, 2004; Shinobu *et al.*, 2007). Sin embargo, determinados factores sugeridos para llevar a cabo las alteraciones del estado fisiológico o inmune del hospedero pueden favorecer el cambio de estado comensal de estas levaduras hacia un estado patogénico, haciéndoles capaces de causar desde infecciones superficiales de las mucosas o, en algunos casos, hasta infecciones sanguíneas diseminadas (Colombo *et al.*, 2006; Vinsonneau *et al.*, 2009; Bruder Nascimento *et al.*, 2010).

Las candidiasis son infecciones fúngicas, predominantemente endógenas y de carácter oportunista, causadas por levaduras pertenecientes al género *Candida*, resultando únicamente en un número reducido de éstas, comprobadamente asociadas al proceso patológico humano, destacándose: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Bruder-Nascimento *et al.*, 2010; Colombo y Guimarães, 2003)

Candida tropicalis es una de las especies de *Candida no albicans*, que prevalece, principalmente, en América Latina (Pfaller *et al.*, 2000). En América del Sur y, específicamente en Brasil, se encuentra como el segundo o tercer agente más frecuente aislado en Infecciones de Corriente Sanguínea (ICS) (Pfaller *et al.*, 2000; Godoy *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2004; Almirante *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2006; Nucci y Colombo, 2007). La misma presenta un considerable potencial biológico como agente oportunista en pacientes con cáncer, leucemia y neutropenia (Wingard, 1995; Nucci *et al.*, 1998; Almirante *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2006; Nucci y Colombo, 2007). Al contrario de *C. albicans*, el descubrimiento de *C. tropicalis* está frecuentemente asociado al desarrollo de infecciones fúngicas sistémicas (Zugg *et al.*, 2001), a pesar de que diversos determinantes de virulencia sean compartidos entre estas dos especies.

El aumento de la resistencia fúngica a las drogas clásicas, sus acciones indeseadas y el alto costo del tratamiento, justifican la investigación de nuevas

estrategias. El uso de plantas en los tratamientos de infecciones está siendo demostrado a lo largo de la historia humana. (Rates, 2001; Bansod y Rai, 2008; Saad *et al.*, 2010).

Dentro de las varias clases de compuestos aislados de plantas con propiedades antimicrobianas, los aceites esenciales son uno de los grupos de compuestos naturales más prometedores, reconocidos por presentar una actividad contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos y antifúngicos (Lima *et al.*, 2006; Castro y Lima, 2010; Saad *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011).

El aceite esencial de hojas de *Eugenia caryophyllata* Thunb. es ampliamente utilizado y muy bien conocido por sus propiedades medicinales. Posee innumerables actividades descritas: antiséptica, analgésica, antibacteriana, antifúngica, anestésica y antimutagénica, entre otras (Kouidhi *et al.*, 2010; Friedman *et al.*, 2002; Gayoso *et al.*, 2005; Alqareer *et al.*, 2006; Miyazawa y Hisama, 2001).

Syzygium aromaticum, *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia aromaticum* y *Eugenia caryophyllus* son sinónimos. Existen solamente pequeñas diferencias entre estas especies, pudiendo ser consideradas como esencialmente la misma. (Schmid, 1972; Burt y Reinders, 2003; Pinto *et al.*, Daniel *et al.*, 2009; Milind y Deepa, 2011).

El aceite proveniente del clavo de la India está compuesto por diferentes constituyentes, siendo el *eugenol* el principal, variando de 49-87%, β -caryophyleno (4-21%) y acetato de *eugenol* (0.5-21%) en pequeñas cantidades de α -humuleno, además de otros constituyentes (Alma *et al.*, 2007).

Desde esta perspectiva, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata*, conocido popularmente como clavo de la India sobre cepas de *Candida tropicalis*, procedentes de aislados clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas fungicas

La cepa estándar ATCC 13803 fue adquirida de la recopilación del laboratorio de Micología de la Universidad Federal de la Paraíba y los aislados clínicos fueron obtenidos del Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes de la Universidad Federal del Ceará, Brasil.

Aceites esenciales

Los aceites fueron adquiridos en la Indústria FERQUIMA, São Paulo.

Análisis del aceite esencial

El aceite esencial fue analizado mediante un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un espectrómetro de masas (EM) (CG-EM-Schimidzu QP-5050A) instrumento equipado con un CG Schmidzu 17A. Columna capilar de sílice fundida con 30 m x 0.25 mm, con 0,25 µm de espesor de película. El helio fue utilizado como gas portador a 0,9 mL/min, con presión de entrada de 48,9 psi. La temperatura inicial de la columna fue de 60° C y se aumentó a 240° C, a razón de 3° C/min y se mantuvo a 240° C durante 10 minutos. Para detección de CG-EM fue utilizado el sistema de energía de ionización de 70 eV. Las muestras fueron diluidas 1/1000 (v/v) en hexano y se inyectó 1,0 µL en el modo de splitless (Adams, 2001). Los compuestos fueron indentificados por comparación de sus patrones de fragmentación reportado en los espectros de masas con los presentes en la biblioteca de espectrómetros de masas 98 NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, EE.UU.) y con los informes de la literatura. La cuantificación de los componentes se basó en el porcentaje de área del pico de cada componente en relación con la superficie total de todos los picos estandarizados en el cromatograma.

Ensayos de actividad antifúngica

Screening microbiológico

Fue utilizada la técnica de difusión en agar con discos de papel de filtro estéril (Lima *et al.*, 1993). Se usaron 20 ml de Agar Sabouraud Dextrosa (ASD), fundido a 45° C, que fue aseptícamente mezclado con 1 ml de la suspensión fúngica (1 x 10⁶ Unidades Formadoras de Colonias - UFC/mL) en placas petri de 90 mm x 15 mm. Después de la solidificación del medio, un disco de papel empapado con 10 µl del aceite esencial *in natura* fue colocado en la superficie del medio de cultivo, en el centro de la placa.

Se incubó a 28° C durante 24 a 48 horas, posteriormente, se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición. Las pruebas se realizaron por duplicado. La actividad antimicótica de los aceites esenciales se consideró positiva cuando los halos de inhibición alcanzaron valores mayores o iguales a 10 mm de diámetro, por lo menos, en el 50% de todas las cepas probadas (Souza *et al.*, 2007).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó por la técnica de microdilución en caldo en microplacas con 96 pocillos de fondo en “U” (Ellof, 1998; Souza *et al.*, 2007). Se obtuvo el inóculo del cultivo de *C. tropicalis* en crecimiento exponencial, donde se tomó una alícuota, suspendiendo ésta en NaCl estéril 0,9%, después ajustando a 0,5 McFarland (lo que corresponde a aproximadamente 1,5x10⁶ UFC/ml), y utilizándose para inocular las microplacas. En una microplaca de 96 pozos se adicionó caldo *sabouraud dextrosa* y el aceite esencial de *E. caryophyllata*, donde se realizaron diluciones seriadas (1:2) con un rango de concentraciones de 1024 hasta 1 µg/ml. Más tarde, fue adicionado el inóculo. Se incubó a 37° C durante 24 a 48 horas, inmediatamente se realizó la lectura y pudo observarse el crecimiento fúngico. La concentración inhibitoria mínima (CIM) es definida como la mínima concentración de un AE que inhibe el crecimiento visible de un hongo.

Determinación de la Concentración Fúngica Mínima (CFM)

Una alícuota de 20µL de cada pozo sin crecimiento fúngico (CIM, CIM x 2, CIM x 4) fue cultivada en una placa con ASD. Seguidamente, se incubó a 35 - 37° C durante 24 horas. La CFM fue considerada como la menor concentración sembrada en ASD donde hubo un crecimiento menor de 3 unidades formadoras de colonias (UFC) (Klepser *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 1999; Correa-Royero *et al.*, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por CG-EM resultó en la identificación de 18 componentes (Tabla 1). Entre los fitoquímicos, eugenol (74%), humuleno (9,9%), δ-cadinene (4,7%) y Trans-β-cariofileno (4,2%) son los principales componentes del aceite esencial de *E. caryophyllata*, otros estudios indican al eugenol como fitoquímico mayor, sin embargo, hay variación en la cantidad de los otros componentes (Ayoola *et al.*, 2008; Alma *et al.*, 2007; Chaieb *et al.*, 2007; Prashar *et al.*, 2006).

El valor del halo de inhibición de los aceites esenciales *in natura* se muestra en la Tabla 2. Sólo los aceites esenciales de *Lavandula officinalis* (alfazema), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) y *Zingiber officinalis* (jengibre) no mostraron actividad frente a las cepas de *C. tropicalis*, ya que el valor mínimo de la zona de inhibición para presentar esta actividad es de 10 mm.

Tabla 1
Los compuestos identificados en el aceite esencial de las hojas de *E. caryophyllata* utilizando CG-EM

Picos	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Índice de retención	% en la formulación
1	5,625	α -Pino	939	0,1
2	8,522	Eucaliptol	1033	1,0
3	11,008	Linalol	1098	0,1
4	22,767	Eugenol	1356	74,2
5	25,524	<i>Trans</i> - β -cariofileno	1418	4,3
6	27,067	Humuleno	1456	9,9
7	27,552	Germacrene-D	1480	0,9
8	28,552	Valenceno	1491	0,7
9	28,881	Farneseno	1509	0,5
10	29,609	δ -Cadineno	1524	4,7
12	30,858	Sage óxido	1552	0,4
13	31,325	Palustrol	1557	0,5
14	31,815	Óxido de cariofileno	1581	1,8
15	32,854	Óxido de humuleno	1600	0,9

Tabla 2

Valores del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento fúngico (mm) producida por los aceites esenciales contra la cepas de *C. tropicalis*

Aceites Esenciales	CT1	CT5	CT6	CT10	CT12	CT17	CT18	CT19	CT20	CT22
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	48	34	50	41	50	42	40	38	44	30
<i>Coriandrum sativum</i>	12	20	10	20	26	10	25	32	29	26
<i>Cymbopogon winterianus</i>	6	10	6	6	10	10	6	6	10	10
<i>Cymbopogon citratos</i>	20	15	15	18	15	16	15	15	15	0
<i>Eugenia caryophyllata</i>	40	48	55	39	54	25	30	39	36	26
<i>Lavandula officinalis</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>Myracrodunon urundeuva</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<i>Origanum vulgare</i>	45	50	42	42	48	42	25	42	40	49
<i>Origanum majorana</i>	10	18	0	20	15	15	10	0	10	10
<i>Zingiber officinale</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eugenia caryophyllata* (clavo) y *Origanum vulgare* (orégano) presentaron la mayor actividad antifúngica, con halos de 42, 39 y 43, respectivamente (Figura 1).

Kouidhi et al., (2010) reportaron la efectividad de AE de *E. caryophyllata* para inhibir el crecimiento de 114 bacterias y 46 levaduras, que son patógenos orales a través del método de difusión en disco.

Figura 1
Actividad antifúngica de los aceites esenciales sobre las cepas de *C. tropicalis* CT 18 e CT 22



1- *L. officinalis*, 2- *C. winterianus*, 3- *C. citratus*, 4- *C. zeylanicum*, 5- *E. caryophyllata*, 6- *O. vulgare*, 7- *C. sativum*, 8- *O. majorana*, 9- *M. urundeuva*, 10- *Z. officinale*.

Fu et al., (2007) encontraron que el AE de clavo inhibió el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas, con halos que van desde 9,5 hasta 19,5 mm y también inhibió el desarrollo de las cepas *C. albicans* y *Aspergillus niger*, con halos de inhibición de 32 y 40 mm, respectivamente, medida semejante a la obtenida en este trabajo. Bansod y Rai (2008) mostraron actividad antifúngica de AE en cepas *A. fumigatus* y *A. niger*.

Los aceites esenciales de clavo de la India procedentes de dos regiones diferentes (Sri Lanka y Zanzíbar) mostraron actividad antimicrobiana frente a los hongos y bacterias seleccionadas sin diferencias significativas (Nzeako et al., 2006).

Varios estudios han demostrado el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales, utilizando diferentes técnicas adaptadas del antifungigrama, como difusión en disco y la técnica de dilución en caldo. Sin embargo, la técnica de microdilución ha proporcionado mejores resultados (Lambert et al., 2001; Hood et al., 2003; Arango et al., 2004; Baydarh et al., 2004; Busatta, 2006).

Determinación de la CIM y CFM

El aceite de *E. caryophyllata* mostró fuerte actividad antifúngica contra las cepas evaluadas, la CIM 100% fue 512 µg/mL y la CFM fue 1024 µg/mL (Tabla 3).

El método de referencia para la técnica de micro dilución en levaduras es descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), no obstante, esto no puede ser seguido estrictamente para evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, ya que las propiedades químicas de estos productos naturales difieren de aquellas presentadas por las sustancias para las que la norma fue estandarizada.

Por lo tanto, se reprodujeron protocolos con las modificaciones necesarias para los aceites esenciales, pues son volátiles, insolubles en agua, viscosos y complejos (Castro et al., 2010; Nascimento et al., 2007; Scorzoni et al., 2007; Hadacek; Greger, 2000).

Nzeako y Lawati (2008) determinaron la CIM del AE del clavo de la India sobre cepas de *C. albicans*. La CIM varía desde 1000 hasta 2500 µg/ml,

mientras la CFM fue 2500 µg/ml, valores mayores a los encontrados en este estudio.

Tabla 3
Valores de CIM y CFM del aceite esencial de *E. caryophyllata* y anfotericina B frente a cepas de *C. tropicalis*

Cepas	<i>E. caryophyllata</i>		Anfotericina B	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
ATCC 13803	512	1024	2	2
CT1	512	1024	2	2
CT5	512	1024	2	2
CT6	512	1024	2	2
CT10	512	1024	2	2
CT12	512	1024	2	2
CT17	512	1024	2	2
CT18	512	1024	2	2
CT19	512	1024	2	2
CT22	512	1024	2	2
CT23	512	1024	2	2
CT27	512	1024	2	2
CT29	512	1024	2	2
CT31	512	1024	2	2
CT33	512	1024	2	2
CT34	512	1024	2	2
CT36	512	1024	2	2
CT37	512	1024	2	2
CT38	512	1024	2	2
CT44	512	1024	2	2

De acuerdo con los criterios esgrimidos por Sartoratto *et al.*, (2004), los aceites esenciales con CIM entre 50 y 500 µg/ml son considerados de fuerte actividad antimicrobiana, teniendo una CIM entre 600 y 1500 µg/ml, mostrando una actividad moderada y un CIM mayor de 1500 µg/ml debe considerarse con actividad baja.

Por lo tanto, se puede considerar que el AE de *E. caryophyllata* tiene fuerte actividad antimicrobiana, ya que la CIM fue 512 µg/ml.

Pinto *et al.*, (2009) determinaron la CIM y CFM del AE de *S. aromaticum* y de su principal fitoquímico, el *eugenol*, sobre cepas de *Candida*, de dermatófitos y de *aspergillus*, utilizando el método de

la macrodilución. La CIM de las cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* varió de 0,32 a 0,64 µL/ml, la CFM osciló entre 0,64-1,25 µL/ml, los hongos dermatofitos fueron más sensibles, la CIM del clavo fue de 0,08-0,16 µL/ml y el CFM varió de 0,16 a 0,32 µL/ml. Sobre las cepas de *aspergillus* el rango de la CIM fue 0,32-0,64 µL/ml y el CFM igual a 1,25 µL/ml.

La CIM del eugenol fue muy similar a la CIM del AE en todas las cepas, enfatizando lo que se ha relatado previamente, de que la actividad antimicrobiana del aceite esencial se atribuye, principalmente, al eugenol, ya que es un compuesto fenólico y ha sido descrita esa actividad en la literatura (Pinto *et al.*, 2009; Ayoola *et al.*, 2008; Nzeako *et al.*, 2006; Burt, 2004).

La falta de estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos ha sido una de las dificultades encontradas para lograr ese tipo de estudio, impidiendo la comparación de los resultados logrados con los relatados en la literatura (Hood *et al.*, 2003).

La acción de los aceites esenciales contra las bacterias gram positivas y hongos parece ser similar. Los componentes de los AE desestabilizan la membrana citoplasmática, derivando en una pérdida y coagulación de su citoplasma, e, incluso, inhiben la respiración celular (Giordani *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2000).

CONCLUSIÓN

Considerando la importancia clínica y epidemiológica representada por las candidiasis causadas por *C. tropicalis*, se puede concluir que este aceite es una fuente importante de sustancias con fuerte actividad antifúngica, que podría ser usado como una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de las infecciones fúngicas. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre esta actividad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la UFPB, CAPES y CNPq (Brazil).

REFERENCIAS

Adams RP. 2001. **Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.

Alma MH, Ertaş M, Nitz S, Kollmannsberger H. 2007. Chemical composition of content of essential

oil from the bud of cultivated Turkish Clove. **Bio Res** 2: 265 - 269.

- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A. 2005. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol** 43: 1829 - 1835.
- Alqareer A, Alyahya A, Andersson L. 2006. The effect of clove and benzocaine versus placebo as topical anesthetics. **J Dent** 34: 747 - 750.
- Antunes AG, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'Azevedo PA, Severo LC. 2004. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev Inst Med Trop** 46: 239 - 241.
- Arango ACM, Sánchez JGB, Galvis LAB. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. **Rev Esp Quimioter** 17: 325 - 331.
- Ayoola GA, Lawore FM, Adelowotan T, Aibinu IE, Adenipekun E, Coker HAB, Odugbemi TO. 2008. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). **Afr J Microbiol Res** 2: 162 - 166.
- Bansod S, Rai M. 2008. Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. **World J Med Sci** 3: 81 - 88.
- Baydarh H, Sagdiç O, Ozkan G. 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control** 15: 169 - 172
- Bruder-Nascimento A, Camargo CH, Sugizaki MF, Sadatsune T, Montelli AC, Mondelli AL, Bagagli E. 2010. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Res Notes** 3: 1 - 5.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **Int J Food Microbiol** 94: 223 - 253.
- Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against

- Escherichia coli O157:H7. **Lett Appl Microbiol** 36: 162 - 167.
- Busatta C, Mossi AJ, Rodrigues MRA, Cansian RL, Oliveira JV. 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Braz J Microbiol** 38: 610 - 616.
- Castro RD, Lima EO. 2010. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP** 39: 179 - 184.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi, AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. **Phytother Res** 21: 501 - 506.
- Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, Yu KW, Fan YH, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ. 2005. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infect Dis** 5: 1 - 5.
- Colombo AL, Guimarães T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop** 36: 599 - 607.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, Da Matta DA, Warnock D, Morgan J. for the Brazilian Network Candidemia Study. 2006. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **J Clin Microbiol** 44: 2816 - 2823.
- Correa-Royero J, Tangarife V, Durán C, Stashenko E, Mesa-Arango A. 2010. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Braz J Pharmacogn** 20: 734 - 741.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J Appl Microbiol** 88: 170 - 175.
- Daniel NA, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Rev Bras Farmacogn** 19: 212 - 217.
- Ellof JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 64: 711 - 713.
- Ernst EJ, Klepser ME, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. 1999. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Mycology** 33: 75 - 80.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **J Food Prot** 65: 1545 - 1560.
- Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XG, Wang Z, Sun S, Efferth T. 2007. Antimicrobial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils Alone and in Combination. **Phytother Res** 21: 989 - 994.
- Gayoso CW, Lima EO, Olivera VT, Pereira FO, Souza EL, Lima EL, Navarro DF. 2005. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia** 76: 247 - 249.
- Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. 2004. Antifungal Effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. **Phytother Res** 18: 990 - 995.
- Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Da Matta DA, Colombo AL. 2003. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98: 401 - 405.
- Hadacek F, Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem Anal** 11: 137 - 147.
- Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J Essent Oil Res** 15: 428 - 433.
- Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. 1998. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. **Antimicrob Agents Chemother** 42: 1387 - 1391.
- Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A. 2010. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. **Ann Microbiol** 60: 599 - 604.

- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microbiol** 91: 453 - 462.
- Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. 1993. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses** 36: 333 - 336.
- Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. 2006. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn** 16: 197 - 201.
- Milind P, Deepa K. 2011. Clove: A Champion Spice. **Int J Res Ayurveda Pharm** 2: 47 - 54.
- Miyazawa M, Hisama M. Suppression of chemical mutagen induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002 umu test. **J Agric Food Chem** 49: 4019 - 4025.
- Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Júnior AMB, Trindade RC. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn** 17: 108 - 113.
- Nucci M, Colombo AL. 2007. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis** 58: 77 - 82.
- Nucci, M.; Silveira, M. I.; Spector, N.; Silveira, F.; Velasco, E.; Martins, C. A.; Derossi, A.; Colombo, A. L.; Pulcheri, W. 1998. Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. **Mycopathologia** 141: 65 - 68.
- Nzeako BC, Al-Kharousi ZSN, Al-Mahrooqui Z. 2006. Antimicrobial Activities of Clove and Thyme Extracts. **Sultan Qaboos Univ Med J** 6: 33 - 39.
- Nzeako BC, Lawati BA. 2008. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. **Afr J Biotechnol** 7: 1612 - 1619.
- Pereira FO, Wanderley PA, Viana FAC, Lima RB, Sousa FB, Santos SG, Lima EO. 2011. Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. **Braz J Pharm Sci** 47: 145 - 153.
- Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, Coffman S, Hollis RJ. 2000. Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997 - 1998. **Antimicrob Agents Chemother** 44: 747 - 751.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Clin Microbiol** 58: 1454 - 1462.
- Prashar A, Locke IC, Evans, CS. 2006. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. **Cell Prolif** 39: 241 - 242.
- Rates SMK. 2001. Plants as source of drugs. **Toxicol** 39: 603 - 613.
- Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui N-E, Hassani L. 2010. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. **Phytomedicine** 17: 1057 - 1060.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz J Microbiol** 35: 275 - 280.
- Schmid RA. 1972. resolution of the *Eugenia-Syzygium* controversy (Myrtaceae). **Am J Bot** 59: 423 - 436.
- Schofield DA, Westwater C, Paulling EE, Nicholas PJ, Balish E. 2003. Detection of *Candida albicans* mRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded, mouse tissues by nested reverse transcription-PCR. **J Clin Microbiol** 41: 831 - 834.
- Scorzoni L, Benaducci T, Almeida AMF, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. 2007. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp. and *Cryptococcus* sp. **Rev Ciênc Farm Básica Apl** 28: 25 - 34.
- Shinobu CS, Ogatta SFY, Bizerra F, Furlaneto L, Peralta RM, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. 2007. Lack of Association Between Genotypes and Virulence Factors in *C. albicans* Strains

- Isolated From Vaginal Secretion. **Braz J Microbiol** 38: 467 - 471.
- Souza EL, Stamford TLM, Lima EO, Trajano VN. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control** 18: 409 - 413.
- Tavanti A, Pardini G, Campa D, Davini P, Lupetti A, Senesi S. 2004. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP1-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. **J Clin Microbiol** 42: 4726 - 4734.
- Vinsonneau C, Benyamina M, Baixench MT, Stephanazzi J, Augris C, Grabar S, Paugam A, Wassermann D. 2009. Effects of candidaemia on outcome of burns. **Burns** 35: 561 - 564.
- Wingard JR. 1995. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis** 20: 115 - 125.
- Wroblewska MM, Swoboda-Kopec E, Rokosz A, Krawczyk E, Marchel H, Luczak M. 2002. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to triazoles. **Int J Antimicrob Ag** 20: 472 - 475.
- Zaugg C, Zepelin MBV, Reichard U, Sanglard D, Monod M. 2001. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun** 69: 405 - 412.