

Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

Juliana Moura Mendes Arrua^{1,2}, Fillipe de Oliveira Pereira³, Felipe Queiroga Sarmiento Guerra², Everardo Albuquerque Menezes⁴, Francisco Afrânio Cunha⁴, Edeltrudes Oliveira Lima².

¹Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Nacional de Asunción – CEMIT, DGICT, UNA, Paraguay.

²Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Paraíba – UFPB, Brasil.

³Centro de Ciencias y Educación, Universidad Federal de Campina Grande – UFCG, Brasil.

⁴Departamento de Análisis Clínicas, Universidad Federal do Ceará – UFC, Brasil.

E mail del autor: aaarrua@gmail.com

Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*. *Candida tropicalis* es una de las especies de *Candida no-albicans* más prevalentes en infecciones del torrente sanguíneo. Muchas especies del género *Candida* han exhibido resistencia a los antifúngicos utilizados en tratamiento. Los aceites esenciales se han presentado como alternativa debido a su potencial actividad antifúngica. El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* es utilizado en la medicina tradicional como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antifúngico. Con el objetivo de corroborar esta última propiedad terapéutica y buscar nuevas alternativas para el tratamiento antifúngico, se evaluó la actividad antifúngica del clavo de olor solo y asociado con anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*. En concentraciones de 512 y 1024 µg/mL se observó inhibición de la formación de pseudohifas y desarrollo de blastoconidios con morfología alterada. El aceite esencial mostró actividad fungicida dependiente de la concentración, y asociada a la anfotericina B presentó efecto aditivo. Los resultados de este trabajo son prometedores, pero son necesarios más estudios para elucidar el mecanismo de acción.

Palabras claves: Candidiasis, efecto aditivo, antifúngico, medicina tradicional, fungicida

***In vitro* Combination of Essential oil of *Eugenia caryophyllata* Thunb and amphotericin B on strains of *Candida tropicalis*.** *Candida tropicalis* is one of the most prevalent *Candida* non-albicans species in bloodstream infections. Many *Candida* species have shown resistance to antifungal agents used in treatment. Essential oils have been presented as an alternative due to their potential antifungal activity. The essential oil of *Eugenia caryophyllata* is used in traditional medicine as an anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antifungal. In order to test for the latter therapeutic property and search for new antifungal treatment alternatives, antifungal activity of clove oil was evaluated alone and associated with amphotericin B on strains of *Candida tropicalis*. At concentrations of 512 and 1024 µg/mL inhibition of pseudohyphal formation and development of blastoconidia with altered morphology were observed. The essential oil showed concentration-dependent fungicidal activity, and additive effect in association with amphotericin B. The results of this study are promising, but further studies are necessary to elucidate the mechanism of action.

Keywords: candidiasis, additive effect, antifungal, traditional medicine, fungicidal

INTRODUCCIÓN

C. albicans, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. krusei* son responsables alrededor del 95% de las infecciones invasivas producidas por hongos del género *Candida* (Pfaller y Diekema 2010). *Candida tropicalis*

es una de las especies de *Candida no-albicans* más prevalente, principalmente en América Latina (Pfaller et al. 2000).

En América del Sur y específicamente en el Brasil, *Candida tropicalis* se encuentra como el tercer agente más frecuente aislado en infecciones del torrente sanguíneo (infecciones sistémicas, candidemias) (Pfaller et al.

Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación *in vitro* del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

2000; Godoy et al. 2003; Antunes et al. 2004; Almirante et al. 2005; Cheng et al. 2005; Colombo, Nucci y Park 2006; Nucci y Colombo 2007; Silva et al. 2011)

Según el agente etiológico, la mortalidad asociada a *C. albicans* varía de 25 a 45% en diferentes estudios, mientras tanto, cuando se refiere a *C. tropicalis*, dichos porcentajes varían entre 40 a 60% (Pappas, Rex y Lee 2003; Nucci y Colombo 2007).

C. tropicalis presenta considerable potencial biológico como agente oportunista en paciente con cáncer, leucemia y neutropenia (Wingard 1995; Nucci et al. 1998; Almirante et al. 2005; Nucci y Colombo 2007; Silva et al. 2011). Al contrario de *C. albicans*, la detección de *C. tropicalis* está frecuentemente asociada con el desarrollo de infecciones fúngicas sistémicas, entretanto diversos determinantes de virulencia son compartidos entre las dos especies (Zaugg y Zepelin 2001; Negri et al. 2012)

Cabe resaltar la existencia de aislados de *Candida* con resistencia *in vitro* e *in vivo* a antifúngicos de uso común destacándose especies de *Candida* no-*albicans*, a las que durante mucho tiempo no se les dio importancia pero que en los últimos años ha crecido la evidencia acerca de la virulencia e importancia de dichas especies (Silva et al. 2011; Nucci y Colombo 2007).

Especies como *C. krusei* y *C. glabrata* presentan resistencia intrínseca al fluconazol, sin embargo, *C. tropicalis* y *C. lusitanae*, también han presentado una progresiva resistencia a dichos antifúngicos. A pesar de presentar varios efectos adversos, algunos relacionados con la infusión (agudos) como: náuseas, vómitos, fiebre, mialgias etc.; y otros relacionados con las dosis (crónicos): anemia y falla renal, la anfotericina B continua siendo el tratamiento de elección para los casos de candidiasis sistémicas (Ostrosky-Zeichner, Marr,

Rex, and Cohen, 2003; Tan et al. 2008; Negri et al. 2012).

Las limitaciones en el tratamiento ha inducido el uso de terapéutica antifúngica combinada, especialmente en pacientes críticos y como alternativa se han estudiado muchas combinaciones de antifúngicos comerciales y productos naturales (Nishi et al. 2009; Mukherjee et al. 2005; Wagner 2005; Rosato et al. 2008; Amber et al. 2010; Saad et al. 2010; Coutinho et al. 2009; Wagner 2011).

Históricamente, entre los productos naturales los extractos vegetales y en especial los aceites esenciales, han se destacado por sus múltiples usos y propiedades en la medicina popular: antiviral, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relajante, anti-séptica, antiinflamatoria entre otras (Nascimento et al. 2007; Park et al. 2007; Singh, Baghotia y Goel 2012).

Dichos conocimientos sirvieron de base para muchos trabajos científicos, los cuales confirmaron la notable actividad antifúngica que los aceites esenciales presentan, entre ellos: *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limon*, *Eucalyptus citriodora*, *Eugenia uniflora* L., *Peumus boldus*, *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon winterianus*, *Thymus vulgaris*, y sus fitoconstituyentes eugenol y carvacrol (Chami et al. 2004; Silva et al. 2012; de O. Lima et al. 2006; Bansod y Rai 2008; Castro y Lima 2010; Oliveira et al. 2011; Pereira et al. 2011; de Lira Mota et al. 2012; Lima et al. 2013; de Oliveira Pereira, Mendes, y de Oliveira Lima 2013).

Shin y Lin, 2004, determinaron la actividad antifúngica de diferentes aceites esenciales sobre cepas de *Trichophyton*, en donde se destacó el fuerte sinergismo entre *Pelargonium graveolens* y ketoconazol sobre cepas de *T. erinacei*, *T. schoenleinii* y *T. soudanense*. Un efecto semejante se observó cuando se evaluó la asociación de sus principales consti-

Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

tuyentes: geraniol y citronelol con ketoconazol, especialmente contra *T. soudanense* y *T. schoenleinii*.

En 2008, Rosato y colaboradores demostraron el efecto sinérgico de la asociación de los aceites esenciales de *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens* con la anfotericina B sobre once cepas de *C. albicans*. Además, la asociación entre *P. graveolens* y anfotericina B se mostró prometedora.

Amber et al. (2010) analizó la interacción del aceite esencial de *Ocimum sanctum* con fluconazol y ketoconazol sobre cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* sensibles y resistentes a fluconazol. De las 74 cepas estudiadas, en apenas 11 cepas no se observó sinergismo.

El aceite esencial de clavo de olor (*cravo da índia*) proviene de botones florales, de las hojas y troncos del árbol de *Syzygium aromaticum* (Oriente), *Eugenia caryophyllata*, *Eugenia aromaticum* (occidente) o *Eugenia caryophyllus*. Existen apenas pequeñas diferencias morfológicas entre estas especies, como presencia y ausencia de pilosidades, pudiendo ser consideradas esencialmente la misma. Además muchos autores citan que son sinónimos (Schmid 1972; Burt and Reinders 2003; Daniel et al. 2009; Milind, Article, y Deepa 2011; Singh et al. 2012)

El aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. es ampliamente utilizado y conocido por sus propiedades farmacológicas: actividad antibacteriana (Cai y Wu 1996; Kouidhi, Zmantar y Bakhrouf 2010; Kalemba y Kunicka 2003; Chaieb y Hajlaoui 2007), actividad antifúngica (Bansod y Rai 2008; Gayoso et al. 2005; Trajano et al. 2009; Singh et al. 2012), antiviral (Chaieb y Hajlaoui, 2007; Kurokawa et al. 1998), como anestésico (Altun, Hunt y Usta 2006; Seol et al. 2007), antioxidante (Jirovetz et al. 2007; Chaieb y Hajlaoui 2007; Yanishlieva, Marinova y

Pokorný 2006), anti-carcinogénico (Lee y Shibamoto 2001), insecticida (Yang, Lee, Lee, Choi y Ahn 2003) y repelente de mosquitos (Trongtokit, Rongsriyam, Komalamisra y Apiwathnasorn 2005). Además es muy utilizado en la gastronomía (Milind et al. 2011).

Dada la importancia de los aceites esenciales, en especial las especias que pueden ser utilizadas como alimentos funcionales y la escasa información sobre sus usos, resulta interesante aumentar el conocimiento sobre su potencial actividad antifúngica, buscando el equilibrio entre la aceptabilidad y la eficacia antimicrobiana (Frutuoso et al. 2013; Burt 2004).

Por todo lo expuesto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de la asociación del aceite esencial de *E. caryophyllata* y la anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis*, observar la acción de dicho aceite sobre la micromorfología y viabilidad fúngica y determinar el tipo de actividad antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos testados: Aceite esencial (AE) de *Eugenia caryophyllata* Thunb. (Cravo da índia, clavo de olor), que fue adquirido de FERQUIMA Ind. y Com./São Paulo y la anfotericina B de Sigma-Aldrich®. El aceite esencial fue analizado previamente por cromatografía gaseosa y se determinó que el principal fitoconstituyente es el eugenol, representando 74,2 %, seguido por el humuleno en un 9,9% (Mendes et al. 2012).

Cepas Fúngicas: Se utilizó una cepa estándar de *Candida tropicalis* ATCC 13803 proveniente del Laboratorio de Micología de la Universidad Federal de Paraíba y cepas clínicas aisladas de sangre CT 01 y CT 05.

Efecto de aceite esencial y anfotericina B sobre la micromorfología de C. tropicalis:

Se utilizó la técnica de micromorfología de levadura, utilizando el medio de cultivo agar-arroz en cámara húmeda (Sidrim y Rocha 2004). Las emulsiones de aceite esencial y anfotericina B equivalentes a la concentración inhibitoria mínima – CIM y CIMx2 (512 y 1024 µg/mL, 2 y 4 µg/mL, respectivamente) fueron agregadas al el medio de cultivo fundido sobre un porta objeto estéril. Después de solidificado, se sembró la cepa en dos estrías que fueron cubiertas con cubre objeto estéril. La placa fue incubada por 24 horas, 35°- 37°C y la preparación fue examinada en microscopio óptico con aumento de 400x para de observar la presencia de estructuras características como pseudohifas y blastoconidios.

Actividad del aceite esencial sobre la viabilidad fúngica de C. tropicalis (Time-kill)

En este ensayo fue observado el comportamiento de las cepas ATCC 13803 y CT 01, frente a las concentraciones inhibitorias mínimas de AE por el método de conteo de unidades formadoras de colonias. Al principio fue inoculada 0,5 mL de la suspensión de levaduras en 4,5 mL de caldo Sabouraud con concentraciones variadas de AE (CIM/2; CIM; CIM×2; CIM×4).

En los intervalos de 0, 2h, 4h, 8h e 24 h después de la incubación, una alícuota de 10 µL del inóculo fue sembrada de forma uniforme en placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa. En las mismas condiciones también fue analizado un grupo control en la ausencia de aceite esencial y antifúngico estándar.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 35-37°C por 24-48 horas. Después del periodo de incubación, se realizó el conteo de células viables, que fue expresado en UFC/mL y presentado en forma del gráfico de la curva de muerte microbiana (Klepser et al. 1998; Klepser et al. 1997).

Cuando hubo una reducción menor que 99,9% o de 3log10 de UFC/mL en comparación al control se consideró que el aceite tiene efecto fungistático; si la reducción fue mayor o igual a 99,9% o 3log10 se atribuye al AE actividad fungicida, o sea, que tiene la capacidad de matar microorganismos, al contrario de lo anterior que apenas inhibe el crecimiento (Correa-Royero, Tangarife, Durán, Stashenko y Mesa-Arango 2010; Ernst, Klepser, Wolfe y Pfaller 1997; Roling et al. 2002).

Ensayo de sinergismo - Método checkerboard

El efecto combinado del AE y el antifúngico estándar fue determinado a partir de la técnica de *checkerboard* para la derivación de índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada (Índice CIF). La turbidez de las suspensiones fúngicas fueron comparadas y ajustadas a la presentada por el tubo 0,5 de la escala McFarland, la cual corresponde a un inóculo de aproximadamente 10⁶ UFC/mL.

Para tal técnica se utilizaron microplacas de 96 pocillos, en forma de “U”. En cada pocillo, inicialmente se agregó 100 µL de medio de cultivo líquido Sabouraud Dextrosa, posteriormente 50 µL de cada producto test en diferentes concentraciones: CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIM×2, CIM×4 e CIM×8, siendo dispensado en sentido vertical el antifúngico estándar (anfotericina B) y en sentido horizontal el aceite esencial, originando diferentes combinaciones entre los dos productos probados.

Por último se agregó 10 µL de las suspensiones fúngicas, para lo cual se utilizaron las cepas ATCC 13803, CT 01 y CT 05. Las placas fueron incubadas a 35°-37°C por 24-48h donde se observó el crecimiento fúngico. El ensayo fue realizado por duplicado.

El índice CIF se calculó por medio de la suma de CIF^A + CIF^B, A; representa el aceite esencial y B, antifúngico estándar. El CIF^A se

calculó utilizando la relación CIM^A combinado/ CIM^A solo, mientras tanto que CIF^B = CIM^B combinado/ CIM^B solo.

Este índice se interpretó de las siguientes formas de sinergismo: sinergismo (<0,5) efecto aditivo (0,5-1,0) indiferencia (>1 e <4) o antagonismo (>4,0) (Correa-Royero et al., 2010; Lewis, Diekema, Messer, Pfaller y Klepser 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios realizados previamente se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y fungicida mínima (CFM) del aceite esencial de *E. caryophyllata*: 512 µg/mL y 1024 µg/mL, respectivamente. Además, se determinó que el eugenol es el principal constituyente del AE en cuestión, lo cual concuerda con lo encontrado en la literatura (Mendes et al. 2012).

En varios estudios, se demostró que la CIM del eugenol, principal fitoconstituyente, es similar al del aceite esencial de *E. caryophyllata*, con lo cual se puede atribuir que la actividad antimicrobiana de dicho aceite es debido al eugenol y también que el fitocomplejo es tan eficaz como el compuesto aislado, que es más caro y difícil de obtenerse (Pinto et al. 2009; Nzeako, Al-Kharousi, y Al-Mahrooqui 2006; S. Burt 2004). Con el objetivo de continuar elucidando el efecto antifúngico de *E. caryophyllata*, se procedió al estudio de la interferencia de dicho AE sobre la micromorfología de *C. tropicalis*

Las señales visibles de acción del AE sobre los hongos, pueden ser observadas por medio de las alteraciones morfológicas a nivel macroscópico y/o microscópico (Kalemba y Kunicka 2003; Mitchell et al. 2010). En la figura 1 se visualizan las alteraciones morfológicas producidas en la cepa CT 01 luego del tratamiento con las concentraciones CIM y CIMx2 del AE y de la anfotericina B en com-

paración con el grupo control. Además, se observó una inhibición de la formación de pseudohifas, alteraciones en la morfología de blastoconidios y formación de vacuolas en las células y pérdida de contenido citoplasmático.

La formación de hifas y pseudohifas se presentan como factores de virulencia expresos por hongos de género *Candida*, que representan una barrera para la fagocitosis impidiendo su eliminación del tejido epitelial. Los cambios en la morfología están asociados a la patogenicidad del microorganismo, además, los factores ambientales influyen en el estado fisiológico de las levaduras comensales, que se vuelve agente causal de las infecciones (Romani, Bistoni, y Puccetti 2003; Whiteway y Oberholzer 2004).

El AE produjo alteraciones en la morfología de las células fúngicas análogas a las producidas por la anfotericina B, que fue utilizado como un control positivo, ya que esta es utilizada en el tratamiento de candidiasis sistémicas. De esta manera, se puede atribuir que este AE posee un moderado potencial antifúngico, ya que fue capaz de inhibir la formación de hifas y pseudohifas.

Con el objetivo de elucidar si el efecto del aceite esencial del clavo de olor es fungistático o fungicida, dependiente o no de la concentración y o/tiempo, se realizó la técnica de *time-kill*, muy utilizada en la evaluación de nuevos antimicrobianos (Pfaller, Sheehan y Rex 2004).

El AE del clavo de olor mostró efecto fungicida (reducción de 99,9%) sobre la cepa CT 01 a concentraciones de 1024 y 2048 µg/mL, después 4 y 2 horas, respectivamente, como se ve en la figura 2. Sobre la cepa ATCC 13803 (figura 3), el efecto fungicida del AE en las mismas concentraciones se mostró apenas después de 24 horas.

La anfotericina B que fue utilizada en la concentración de 2 µg/mL, correspondiente a la CIM, mostró actividad fungistática sobre

Steviana Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*

las dos cepas, expresando que su actividad fungicida es dependiente de la concentración (Ernst et al. 1997; Klepser et al. 1997).

De esta manera, se puede decir que este AE presenta actividad dependiente de su concentración, o sea, cuando se aumenta su concentración, mejora el efecto, pasando de fungistático a fungicida. La actividad fungicida es clínicamente más importante de que la fungistática, pese a que no depende del sistema inmunológico para resolver la infección. Se debe resaltar que pacientes inmunodeprimidos necesitan hacer uso profiláctico de drogas fungistáticas, lo cual aumenta la frecuencia del consumo de drogas con resistencia innata o adquirida en casos clínicos (Monk y Goffeau 2008).

Además, cabe resaltar que Márquez, 2010 evaluó la citotoxicidad de la fracción hexánica del clavo de olor sobre líneas celulares normales OK, LLC-PK1 y CHANG en concentraciones de 1000, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$, en donde se encontró un alto porcentaje de viabilidad de las células normales, por encima de 60%. Estos resultados nos estimularon a seguir investigando el efecto del aceite esencial de clavo de olor.

La sinergia entre los agentes antifúngicos ha sido muy utilizada en la clínica médica, siendo evaluado en laboratorio por la técnica de *checkerboard*, que tiene la ventaja de ser fácil de ejecutar y estandarizar (White et al. 1996; Lewis et al. 2002; Hemaiswarya, Kruthiventi y Doble 2008)

Tras a la evaluación del sinergismo entre anfotericina B y el AE de *E. caryophyllata* sobre las cepas clínicas CT 01 y CT 05 y la cepa estándar ATCC 13803 de *C. tropicalis* se observó la disminución de los valores de CIM para ambos productos testeados: una reduc-

ción de 87,5% y 50% en los valores de CIM del AE de Clavo de olor y anfotericina B, respectivamente.

Como se expresa en la tabla 1, el valor de índice de CIF (ICIF) fue de 0,6; lo cual indican un efecto aditivo de la asociación del AE y la anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis*.

La utilización de combinados de productos naturales y antigúngicos en la clínica es cada vez mayor, lo cual se ve reflejado en el aumento de las publicaciones en los últimos años en el área de investigación con fitofármacos (Wagner y Ulrich-Merzenich 2009; Amber et al. 2010; de Lira Mota et al. 2012; de Oliveira Pereira, Mendes y de Oliveira Lima 2013).

La combinación de compuestos derivados de plantas y antibióticos ya fueron probados contra diferentes agentes infecciosos (Hemaiswarya, Kruthiventi y Doble 2008; Amber et al. 2010; Coutinho, Costa, Lima, Falcão-Silva y Siqueira 2009), destacándose la levadura del género *Candida* (Han 2007; Shin y Pyun 2004; Giordani et al. 2004; Saad et al. 2010; Silva et al. 2012).

Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Shin y Pyun 2004 y Silva et al. 2011, que describieron el efecto aditivo de la asociación de aceites esenciales y antifúngicos utilizados en la clínica sobre cepas de *C. tropicalis*.

Este tipo de asociación puede ampliar los espectros de acción y eficacia de cada droga, permitiendo así la utilización de concentraciones menores de cada droga, reduciendo los posibles efectos adversos y/o tóxicos (Cuenca-Estrella 2004; Lewis, Viale y Kontoyiannis 2012).

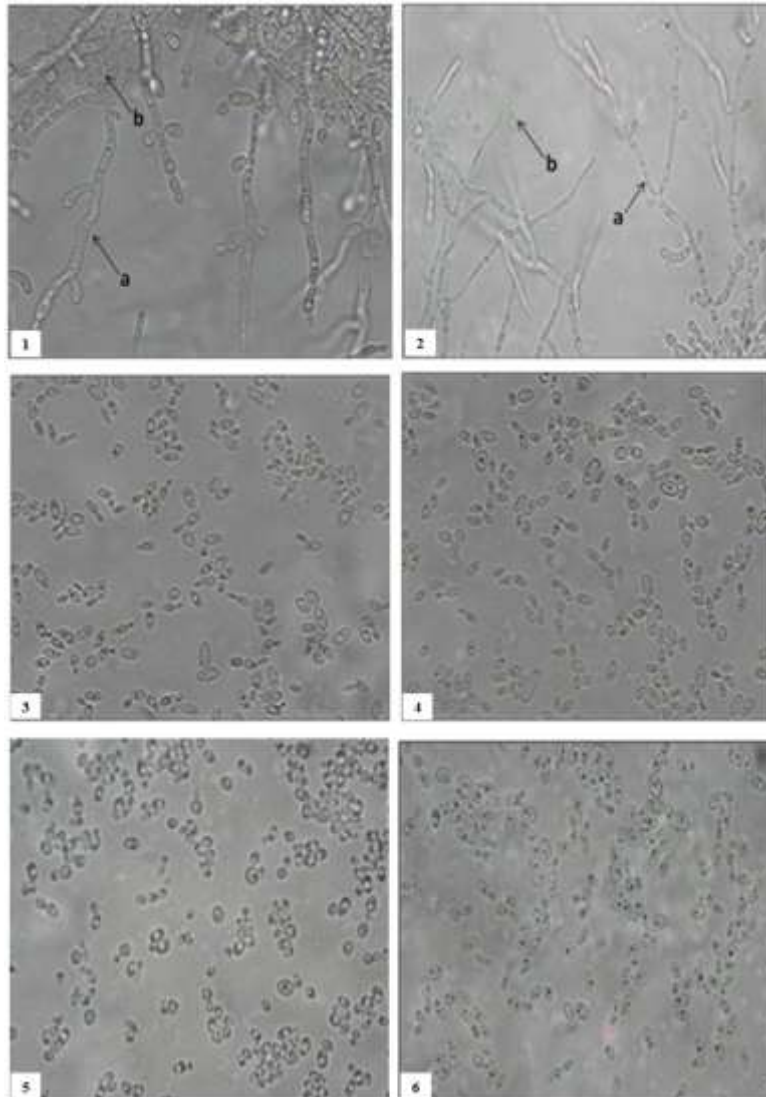


Figura 1: Aspecto microscópico de la *C. tropicalis* cepa CT 01, utilizando la técnica de microcultivo. 1, 2: control; 3: expuesto a anfotericina B – CIM; 4: expuesto a anfotericina B – CIMx2; 5: expuesto al AE de *E. caryophyllata* – CIM; 6: expuesto al AE de *E. caryophyllata* – CIMx2. a: pseudohifas; b: blastoconidios. Aumento de 400x.

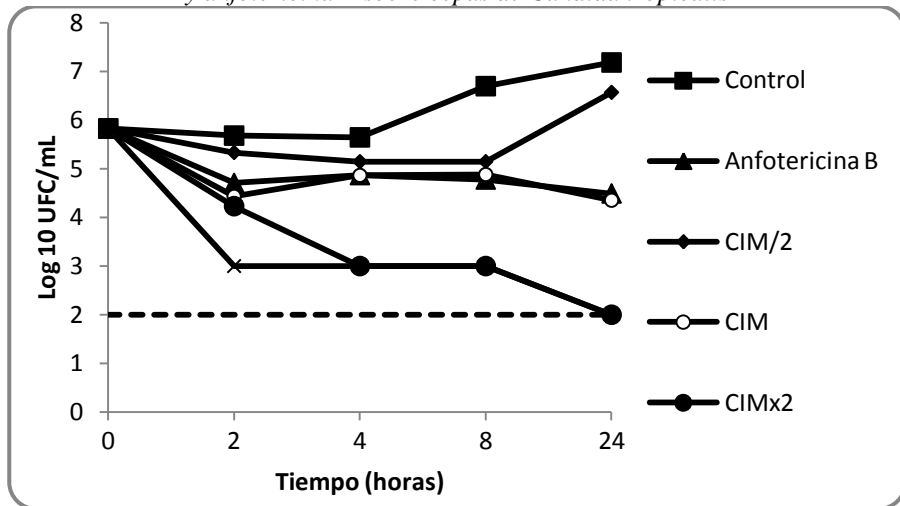


Figura 2: Viabilidad de las estructuras fúngicas de *C. tropicalis* CT01 en Log₁₀UFC/mL

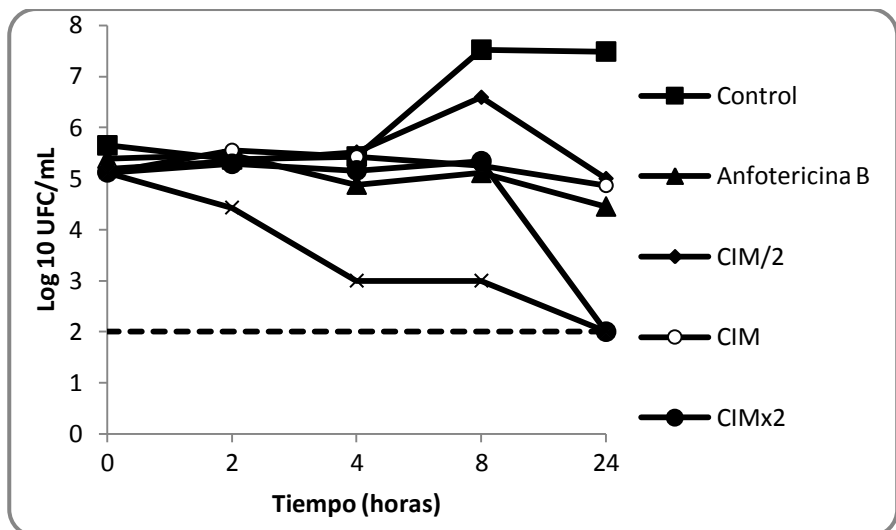


Figura 3: Viabilidad de estructuras fúngicas de *C. tropicalis* ATCC 13803 en Log₁₀UFC/mL

Tabla 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM - µg/mL) e Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF) después de la combinación del aceite esencial de *E. caryophyllata* con Anfotericina B sobre cepas de *C. tropicalis* CT01, CT05 y ATCC 13803.

Cepas	CIM asociadas (µg/mL)		CIF ^a		ICIF ^b
	AE	Anfotericina B	AE	Anfotericina B	
ATCC 13803	64	1	0,1	0,5	0,6
CT 01	64	1	0,1	0,5	0,6
CT 05	64	1	0,1	0,5	0,6

^aConcentración Inhibitoria Fraccional; ^bÍndice CIF

CONCLUSIONES

En base a nuestros resultados, podemos concluir que el aceite esencial de clavo de olor produce importantes alteraciones micromorfológicas sobre las cepas de *C. tropicalis*, y que su actividad antifúngica es del tipo fungicida dependiente de la concentración y tiempo, además que su asociación con el antifúngico de elección clínica, en este caso la anfotericina B, expresa un efecto aditivo. De esta forma, este aceite esencial se presenta como un prometedor producto antifúngico en el tratamiento de la candidiasis, aunque es necesario dar continuidad a los ensayos para asegurar un futuro uso *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Almirante, B., Rodríguez, D., Park, B. J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A. M., Almela, M., 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1829–1835. doi:10.1128/JCM.43.4.1829-1835.2005

Altun, T., Hunt, A. Ö., & Usta, F. (2006). Effects of Clove Oil and Eugenol on Anaesthesia and Some Hematological Parameters of European Eel *Anguilla anguilla*, L., 1758. *Journal of Applied Animal Research*, 30(2), 171–176. doi:10.1080/09712119.2006.9706612

Amber, K., Aijaz, A., Immaculata, X., Luqman, K. a., & Nikhat, M. (2010). Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(12), 921–5. doi:10.1016/j.phymed.2010.02.012

Antunes, A. G. V., Pasqualotto, A. C., Diaz, M. C., d’Azevedo, P. A., & Severo, L. C. (2004). Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(5), 239–241. doi:/S0036-46652004000500001

Bansod, S., & Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*,

- Steviana* Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*
- 3(2), 81–88. Retrieved from [http://idosi.org/wjms/3\(2\)08/7.pdf](http://idosi.org/wjms/3(2)08/7.pdf)
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Burt, S. a, & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581376>
- Cai, L., & Wu, C. D. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*, 59(10), 987–990. doi:10.1021/np960451q
- Castro, R. D., & Lima, E. de O. (2010). Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 39(3), 179–184.
- Chaieb, K., & Hajlaoui, H. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy ...*, 506(December 2006), 501–506. doi:10.1002/ptr
- Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J., & Remmal, a. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 8(3), 217–26. doi:S1413-86702004000300005
- Cheng, M.-F., Yang, Y.-L., Yao, T.-J., Lin, C.-Y., Liu, J.-S., Tang, R.-B., ... Lo, H.-J. (2005). Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, 5, 22. doi:10.1186/1471-2334-5-22
- Colombo, A., Nucci, M., Park, B., Nouér, S., Arthington-Skaggs, B., da Matta, D., ... Morgan, J. (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical ...*, 44(8), 2816–2823. doi:10.1128/JCM.00773-06
- 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*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(5), 734–741. doi:10.1590/S0102-695X2010005000021
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Lima, E. O., Falcão-Silva, V. S., & Siqueira, J. P. (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 13. doi:10.1186/1472-6882-9-13
- Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Lima, E. O., Falcão-Silva, V. S., & Siqueira-Júnior, J. P. (2009). Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *In Vivo (Athens, Greece)*, 23(2), 287–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414416>
- Cuenca-Estrella, M. (2004). Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Journal of Antimicrobial ...*, 54(5), 854–69. doi:10.1093/jac/dkh434

- Daniel, A. N., Sartoretto, S. M., Schmidt, G., Caparroz-assef, S. M., Bersani-amado, C. A., Cuman, R. K. N., & Merr, E. L. (2009). Artigo Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(November 2008), 212–217.
- De Lira Mota, K. S., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W. A., Lima, I. O., & de Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(12), 14418–33. doi:10.3390/molecules171214418
- De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., & de Oliveira Lima, E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology*, 51(5), 507–13. doi:10.3109/13693786.2012.742966
- Ernst, M. E., Klepser, M. E., Wolfe, E. J., & Pfaller, M. a. (1997). Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 26(3-4), 125–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9078447>
- Frutuoso, A. E., Teotonio, N., Leda, T., Lemos, G. De, Coelho, E. L., Maria, D., & Teixeira, A. (2013). REBRAPA. *Revista Brasileira de Pesquisa Em Alimentos*, 4(2), 69–81.
- Gayoso, C. W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., & Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76(2), 247–249. doi:10.1016/j.fitote.2004.12.005
- 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*. *Phytotherapy Research*, 18(12), 990–5. doi:10.1002/ptr.1594
- Godoy, P., Tiraboschi, I. N., Severo, L. C., Bustamante, B., Calvo, B., Almeida, L. P. De, ... Colombo, A. L. (2003). Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), 401–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12886424>
- Han, Y. (2007). Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14(11), 733–738. doi:10.1016/j.phymed.2007.08.004
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(8), 639–52. doi:10.1016/j.phymed.2008.06.008
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A. S., Denkova, Z., Nikolova, R., & Geissler, M. (2007). Purity, Antimicrobial Activities and Olfactoric Evaluations of Geraniol/Nerol and Various of Their Derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, 19(3), 288–291. doi:10.1080/10412905.2007.9699283
- Kalemba, D., & Kunicka, a. (2003). Antibacterial and antifungal properties of

- essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678685>
- Klepser, M. E., Ernst, E. J., Ernst, M. E., Messer, S. a, & Pfaller, M. a. (1998). Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(6), 1387–91. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=105609&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Klepser, M. E., Wolfe, E. J., Jones, R. N., & Nightingale, C. H. (1997). Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(6), 1392–1395.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. *Annals of Microbiology*, 60(4), 599–604. doi:10.1007/s13213-010-0092-6
- Kurokawa, M., Hozumi, T., Basnet, P., Nakano, M., Kadota, S., Namba, T., ... Shiraki, K. (1998). Purification and Characterization of Eugeniin as an Anti-herpesvirus Compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284(2), 728–735. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/content/long/284/2/728>
- Lee, K.-G., & Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*, 74(4), 443–448. doi:10.1016/S0308-8146(01)00161-3
- Lewis, R. E., Diekema, D. J., Messer, S. a, Pfaller, M. a, & Klepser, M. E. (2002). Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(2), 345–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815578>
- Lewis, R. E., Viale, P., & Kontoyiannis, D. P. (2012). The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*, 3(4), 368–76. doi:10.4161/viru.20746
- Lima, I. de O., Oliveira, R. de A. G., Lima, E. de O., Farias, N. M. P., & Souza, E. L. De. (2006). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2), 197–201.
- Lima, I. O., Pereira, F. de O., Oliveira, W. A. de, Lima, E. de O., Menezes, E. A., Cunha, F. A., & Diniz, M. de F. F. M. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*, 25(2), 138–142. doi:10.1080/10412905.2012.754728
- Márquez, B. P. (2010). *Componentes químicos con actividad bactericida, fungicida y citotóxica de plantas de la familia Myrtaceae y Lauraceae*. Universidad Autónomas de Nuevo León. Retrieved from http://eprints.uanl.mx/2710/1/tesis_doctorado_BPM.pdf
- Mendes, J. M., Sarmiento Guerra, F. Q., Oliveira Pereira, F. de, Pereira de Sousa, J., Nogueira Trajano, V., & Oliveira Lima, E. de. (2012). Actividad antifúngica del

- Steviana* Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*
- aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. ... *Latinoamericano Y Del ...*, 11(3), 208–217. Retrieved from <http://www.indi.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/621>
- Milind, P., Article, R., & Deepa, K. (2011). Available online through CLOVE: A CHAMPION SPICE. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 2(1), 47–54.
- Mitchell, T. C., Stamford, T. L. M., Souza, E. L. de, Lima, E. de O., & Carmo, E. S. (2010). *Origanum vulgare* L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 755–760. doi:10.1590/S0101-20612010000300029
- Monk, B. C., & Goffeau, A. (2008). Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), 367–369. doi:10.1126/science.1159746
- Mukherjee, P. K., Sheehan, D. J., Christopher, A., Ghannoum, M. A., & Hitchcock, C. A. (2005). Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1). doi:10.1128/CMR.18.1.163
- Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antonioli, Â. R., Santos, P. O., Barbosa Júnior, A. M., & Trindade, R. C. (2007). Divulgação Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(1), 108–113.
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., & Oliveira, R. (2012a). Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1399–1412. doi:10.1007/s10096-011-1455-z
- Negri, M., Silva, S., Henriques, M., & Oliveira, R. (2012b). Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1399–1412. doi:10.1007/s10096-011-1455-z
- Nishi, I., Sunada, A., Toyokawa, M., Asari, S., & Iwatani, Y. (2009). In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 15(1), 1–5. doi:10.1007/s10156-008-0653-9
- Nucci, M., & Colombo, A. L. (2007a). Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 77–82. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.009
- Nucci, M., & Colombo, A. L. (2007b). Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(1), 77–82. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.009
- Nucci, M., Silveira, M. I., Spector, N., Silveira, F., Velasco, E., Martins, C. A., ... Pulcheri, W. (1998). Fungemia in cancer patients in Brazil: Predominance of non-albicans species. *Mycopathologia*, 141(2), 65–68. doi:10.1023/A:1006951619245
- Nzeako, B. C., Al-Kharousi, Z. S. N., & Al-Mahrooqi, Z. (2006). Antimicrobial

- activities of clove and thyme extracts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 6(1), 33–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3074903&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oliveira, W. A. de, Pereira, F. de O., Luna, G. C. D. G. de, Lima, I. O., Wanderley, P. A., Lima, R. B. de, & Lima, E. de O. (2011). Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor against *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 433–441. doi:10.1590/S1517-83822011000200004
- Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. a, Rex, J. H., and Cohen, S. H. (2003). Amphotericin B: time for a new “gold standard”. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 37(3), 415–25. doi:10.1086/376634
- Pappas, P., Rex, J., and Lee, J. (2003). A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clinical Infectious ...*, 0006, 0–9. Retrieved from <http://cid.oxfordjournals.org/content/37/5/634.short>
- Park, M., Gwak, K., Yang, I., Choi, W., Jo, H., Chang, J., ... Choi, I. (2007). Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology*, 45(5), 460–465.
- Pereira, F. de O., Wanderley, P. A., Viana, F. A. C., Lima, R. B. de, Sousa, F. B. de, Santos, S. G. dos, and Lima, E. de O. (2011). Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(1), 145–153. doi:10.1590/S1984-82502011000100018
- Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., and Houston, A. (2000). Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998, 44(3), 747–751.
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., and Rex, J. H. (2004). Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization, 17(2), 268–280. doi:10.1128/CMR.17.2.268
- Pinto, E., Vale-Siva, L., Cavaleiro, C., and Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(The composition and antifungal activity of clove essential oil (EO), obtained from *Syzygium aromaticum*, were studied. Clove oil was obtained commercially and analysed by GC and GC- MS. The EO analysed showed a high content of eugenol (85.3 %). MICs, deter), 1454–1462. doi:10.1099/jmm.0.010538-0
- Roling, E. E., Klepser, M. E., Wasson, A., Lewis, R. E., Ernst, E. J., and Pfaller, M. A. (2002). Antifungal activities of fluconazole, caspofungin (MK0991), and anidulafungin (LY 303366) alone and in combination against *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* via time-kill methods, 43, 13–17.
- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2003). Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Current Opinion in*

- Steviana* Vol. 6. 2014. Moura et al. Asociación in vitro del aceite esencial *Eugenia caryophyllata* Thunb. y anfotericina B sobre cepas de *Candida tropicalis*
- Microbiology*, 6(4), 338–343. doi:10.1016/S1369-5274(03)00081-X
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., and Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(8), 635–8. doi:10.1016/j.phymed.2008.05.001
- Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N., and Hassani, L. (2010). Phytomedicine Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *European Journal of Integrative Medicine*, 17(13), 1057–1060. doi:10.1016/j.phymed.2010.03.020
- Schmid, R. (1972). A Resolution of the *Eugenia-Syzygium* Controversy (Myrtaceae). *American Journal of Botany*, 59(4), 423. doi:10.2307/2441553
- Seol, D.-W., Lee, J., Im, S.-Y., and Park, I.-S. (2007). Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). *Aquaculture Research*, 38(1), 45–49. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01622.x
- Shin, S., and Pyun, M.-S. (2004). Anti-*Candida* effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(10), 827–830. doi:10.1002/ptr.1573
- Sidrim, J. J. C., and Rocha, M. F. G. (2004). *Micologia médica à luz de autores contemporâneos* (1st ed., p. 408). GUANABARA. Retrieved from <http://books.google.com.py/books?id=5hTsGwAACAAJ>
- Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., and Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 19(1), 42–47. doi:10.1016/j.phymed.2011.06.033
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Williams, D. W., and Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Federation of European Microbiological Societies*, 36, 288–305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Singh, J., Baghotia, A., and Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469–1475.
- Tan, T., Tan, A., Tee, N., and Ng, L. (2008). A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Ann Acad Med Singapore*, 37(10), 835–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19037517>
- Trajano, V. N., Lima, E. de O., Souza, E. L. de, and Travassos, A. E. R. (2009). Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 542–545. doi:10.1590/S0101-20612009000300014
- Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., and Apiwathnasorn, C. (2005). Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research: PTR*, 19(4), 303–9. doi:10.1002/ptr.1637
- Wagner, H. (2005). Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st

- century: New developments and challenges. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 1–6. doi:10.1351/pac200577010001
- Wagner, H. (2011). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1), 34–7. doi:10.1016/j.fitote.2010.11.016
- Wagner, H., and Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2), 97–110. doi:10.1016/j.phymed.2008.12.018
- White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., and Bosso, J. a. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1914–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Whiteway, M., and Oberholzer, U. (2004). *Candida* morphogenesis and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4), 350–7. doi:10.1016/j.mib.2004.06.005
- Wingard, J. R. (1995). Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20(1), 115–125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727637>
- Yang, Y.-C., Lee, S.-H., Lee, W.-J., Choi, D.-H., and Ahn, Y.-J. (2003). Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4884–4888. doi:10.1021/jf034225f
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., and Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(9), 776–793. doi:10.1002/ejlt.200600127
- Zaugg, C., and Zepelin, M. B. (2001). Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. *Infection and ...*, 69(1), 405–412. doi:10.1128/IAI.69.1.405