Multiciência Online
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Santiago
ISSN 2448-4148

Avaliação da suscetibilidade de *Candida* spp frente ao extrato etanólico de *Eugenia involucrata* DC

Suscetibilidade de *Candida* spp a *Eugenia involucrata* DC

Evaluation of the susceptibility of *Candida* spp to the ethanolic extract of *Eugenia involucrata* DC

Susceptibility of *Candida* spp to *Eugenia involucrata* DC

Thaís Felli Kubiça[1], Thainara de Andrade Fortes[2], Lenise de Lima Silva[3], Amanda Leitão Gindri[1], Sydney Hartz Alves[2], Thaylise Vey Parodi[1], Tairine Patias de Freitas[1], Alexia Machado de Oliveira[1], Gabriela Valente[1], Cristiele Fiuza Soares[1], Lisiane Bianchini[1]

[1] Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI Campus Santiago, Curso de Farmácia. thaiskubica@urisantiago.br

[2] Universidade Federal de Santa Maria, Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

[3]Universidade Federal de Santa Maria, Pós-graduação em Farmacologia.

RESUMO

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies e estes microrganismos comensais são capazes de desenvolver infecções fúngicas superficiais em indivíduos sadios e também infecções sistêmicas em pacientes debilitados. O gênero *Eugenia* l. (Myrtaceae) compreende 14 espécies, dentre elas a *E. involucrata* conhecida na Região Sul como cerejeira do mato. Esta espécie é utilizada popularmente como antidiarreica, antirreumática, diurética e antitussígena. No entanto, até o presente momento são escassos os estudos explorando de sua atividade antimicrobiana. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de *C. albicans* (ATCC 14053)*, C. glabrata* (isolado clínico)*, C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. dubliniensis* (isolado clínico) frente ao extrato etanólico de *E. involucrata.* As partes aéreas

da planta foram coletadas na cidade de Santa Maria-RS em setembro de 2014, secas em estufa (com temperatura em torno de 35ºC), moídas, extraídas em aparelho de Soxlhet com etanol 95% até sua exaustão e concentradas em rotaevaporador. Para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs), utilizou-se o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008), e as leituras dessas foram baseadas na inibição de 100% do crescimento fúngico, em comparação ao controle positivo. O rendimento extrativo de *E. involucrata* foi de 17,73± 1,98 % (média ± DP). No entanto, quanto à avaliação da atividade antifúngica, o extrato não apresentou ação inibitória até a concentração máxima testada (2000 µg/mL) contra as cepas em estudo. Apesar do extrato etanólico de *E. involucrata* não apresentar atividade inibitória e fungicida frente aos microrganismos testados, as propriedades antimicrobianas já relatadas para outras espécies do gênero *Eugenia*, além da relativa baixa toxicidade dos produtos naturais, enfatizam a necessidade de continuidade dos estudos de investigação de sua atividade frente a outros microrganismos.

Palavras-chave: Candidíase. Cerejeira do mato. *Myrtaceae*

ABSTRACT

The genus *Candida* comprises approximately 200 species and these commensal microorganisms are able to develop superficial fungal infections in healthy individuals and systemic infections in debilitated patients. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) comprises 14 species, among them *E. involucrata* known in the Southern Region as cherry woodland. This species is popularly used as antidiarrheal, antirheumatic, diuretic and antitussive. However, to date, there are few studies exploring its antimicrobial activity. This study aimed to evaluate the susceptibility of *C. albicans* (ATCC 14053), *C. glabrata* (clinical isolate), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) and *C. dubliniensis* (clinical isolate) against the ethanolic extract of *E. involucrata*. The aerial parts of the plant were collected in Santa Maria (RS) in September 2014, oven dried (with temperature around 35ºC), extracted with a Soxlhet apparatus with 95% ethanol until exhausted and concentrated in a rotary evaporator. The M27-A3 protocol (CLSI, 2008) was used to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs), and the readings were based on 100% inhibition of fungal growth, compared to the positive control. The extractive yield of *E. involucrata* was 17.73 ± 1.98 % (mean

± SD). However, for the evaluation of the antifungal activity, the extract did not present inhibitory action until the maximum concentration tested (2000 µg/mL) against the strains under study. Although the ethanolic extract of *E. involucrata* does not present inhibitory and fungicidal activity against the tested microorganisms, the antimicrobial properties already reported for other *Eugenia* species, in addition to the relatively low toxicity of natural products, emphasize the need for continuity of the research studies of their activity against other microorganisms.

Key words: Candidiasis. Cerejeira do mato. *Myrtaceae.*

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* compreende aproximadamente 200 espécies, dentre elas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis, C. krusei, C. tropicalis* (PFALLER & DIEKEMA 2004, SIDRIM & ROCHA 2004, ZOMORODIAN et al. 2011). Estes microrganismos comensais são capazes de desenvolver infecções fúngicas superficiais em indivíduos sadios como também infecções sistêmicas em pacientes debilitados. Tais infecções podem ser decorrentes de alterações no sistema imunológico, rompimento de barreiras anatômicas e alterações na microbiota normal do hospedeiro (COLOMBO & GUIMARÃES 2003).

A candidemia, infecção na corrente sanguínea por *Candida* spp., representa um problema mundial de saúde pública, uma vez que é responsável por taxas de morbidade e mortalidade entre 40 e 60% em adultos (COLOMBO & GUIMARÃES 2003) e entre 10 e 47% em crianças acometidas (MOTTA et al. 2016). Além disso, a resistência aos antifúngicos existentes é um dos fatores responsáveis pela elevada prevalência de candidíase atualmente (VIEIRA, NASCIMENTO 2017). Estudos têm demonstrado diferentes espécies de *Candida* resistentes aos azóis, bem como forte toxicidade ligada ao uso dos poliênicos (PFALLER et al. 1999; ELIIS 2002, BAGINSK et al. 2005). Sensibilidade diminuída a anfotericina B, flucitosina e às equinocandinas também já foram documentadas (PFALLER et al. 2006, PFALLER & DIEKEMA 2007, WARNOCK 2007).

Dessa forma, faz-se necessário a investigação sobre novos agentes antifúngicos que sejam eficazes e seguros para o tratamento destas infecções. O estudo com produtos naturais se torna uma possível alternativa para o descobrimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. (PEREIRA 2009).

O gênero *Eugenia* (Myrtaceae) compreende 14 espécies, dentre elas a *E. uniflora*, conhecida popularmente no Brasil como pitanga**,** e a *E. involucrata* conhecida na Região Sul como cerejeira do mato (FIÚZA et al. 2009). A atividade biológica de *E. uniflora* tem sido frequentemente relatada na literatura por vários autores (HOLETZ et al. 2002; AURICCHIO et al. 2006, FIÚZA 2008, VICTORIA et al. 2011, BEZZERA et al. 2012). Apesar de *E. involucrata* ser utilizada popularmente como antidiarréica, anti-reumárica, diurética e antitussígena (BARATA-SILVA et al. 2005, CASTRO 2006), a sua atividade antimicrobiana ainda é insuficientemente explorada, sendo que, os poucos estudos relatados na literatura evidenciaram, por vezes, atividade promissora frente à alguns microrganismos testados (CIPRIANI 2016; TOLEDO 2018).

Nesse contexto, considerando as altas taxas de mortalidade decorrentes de infecção disseminada em pacientes imunocomprometidos, a resistência de *Candida* spp. à terapia disponível atualmente, aliado a relativa baixa toxicidade dos produtos naturais, o presente trabalho propõe a investigação das propriedades antifúngicas do extrato etanólico das partes aéreas de *Eugenia involucrata* frente à *C. albicans, C. glabrata, C.parapsilosis, C. dubliniensis.*

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

A planta foi coletada em setembro de 2014 na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil (29º 38 '41,5' 'S; 53º 47' 5,7 '' W). Posteriormente, as folhas foram secas em estufa (com temperatura em torno de 35ºC) e pulverizadas em moinho de facas. A exsicata (SMDB nº 16107) foi depositada no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e identificados pelo Prof. Dr. Renato Záchia, da UFSM. Para obter o extrato, as folhas foram submetidas à percolação em aparelho Soxlhet com etanol a 95%

até a exaustão. Depois, o extrato foi concentrado em um evaporador rotativo sob vácuo sob temperatura inferior a 40 ° C e armazenado sob refrigeração até os testes. Todo o processo extrativo foi realizado quatro vezes. O rendimento do extrato foi calculado a partir do seu peso seco.

Ensaios de suscetibilidade

Microrganismos

Os microrganismos que foram utilizados nos testes de suscetibilidade pertencem à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS e estão descritos na Tabela I:

Tabela I- Microrganismos utilizados nos testes de suscetibilidade frente ao extrato etanólico de *E. involucrata.*

Microrganismos	
Candida albicans	Cepa padrão (ATCC 14053)
Candida glabrata	Isolado clínico
Candida parapsilosis	Cepa padrão (ATCC 22019)
Candida dubliniensis	Isolado clínico

Preparo da solução estoque de *E. involucrata*

Para obter-se a solução estoque, 200 mg de extrato etanólico de *E. involucrata* foram pesados e diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando Bécker.

A partir da solução estoque em DMSO, foram realizadas diluições intermediárias (1:100) em caldo RPMI 1640 tamponado com ácido morfolínicopropanossulfônico (MOPS), a fim de se eliminar qualquer possibilidade de interferência do DMSO na atividade antifúngica. Estas diluições intermediárias foram feitas diretamente na placa utilizando micropipeta multicanal.

ISSN 2448-4148

Ensaios de microdiluição para *Candida* spp

A suscetibilidade de *Candida* spp frente ao extrato etanólico de *E. involucrata* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo RPMI, de acordo com o protocolo M27-A3 aprovado pelo "*Clinical and Laboratory Standards Institute*" (CLSI 2008).

Para os ensaios de microdiluição, os isolados de *Candida* spp. foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose e incubados a 35ºC em estufa por 48 horas. A suspensão do inóculo foi preparada por método espectrofotométrico e a densidade ótica da suspensão de conídios será ajustada com caldo RPMI 1640 até 1 x 10^3 UFC/mL. Volumes de 100 µL de inóculo de cada isolado foram depositados nos poços de placas de poliestireno com fundo chato já contendo igual volume do extrato de *E. involucrata.* A faixa de concentração final do extrato de *E. involucrata* nos poços das placas de microdiluição ficou entre 2000 e 3,906 µg/mL.

Após a distribuição do extrato e inóculos, as placas foram incubadas a 35ºC em estufa, e as CIMs determinadas após 48 horas para *Candida* spp. As leituras das CIMs para o extrato de *E. involucrata* foram baseadas em 100% de inibição quando comparado ao crescimento do controle positivo, para cada microrganismo.

Adicionalmente, foi determinada, também, a concentração fungicida mínima (CFM), onde uma alíquota de 10 µL dos poços em que não houve crescimento detectável foi pipetada e semeada em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud. A CFM foi considerada onde não houve o crescimento fúngico.

Foram considerados resultados promissores valores de CIMs menores do que 100 µg/mL (HOLETZ et al. 2002).

RESULTADOS

Rendimento do extrato etanólico de *E. involucrata* DC

O extrato etanólico de *Eugenia involucrata* foi obtido por quatro extrações em aparelho de Soxlhet. Após ser feita a concentração destes extratos em evaporador rotatório sob vácuo, calculou-se um rendimento de 27,9 ± 1,64 % (média ± EPM) do extrato em relação à massa de planta utilizada para fazer as extrações. Os resultados das quatro extrações estão descritos detalhadamente na Tabela II.

Tabela II – Rendimento obtido na extração do extrato etanólico de *E. involucrata*, o qual está expresso da forma de média ± Desvio Padrão (DP).

Extrações	Massa de planta (g)	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
1ª	187,91	29,39	15,65
2ª	156,26	31,59	20,21
3ª	144,40	26,49	18,34
4ª	144,00	24,12	16,75
Média ± DP			17,73± 1,98

Testes de suscetibilidade

Os resultados de CIMs e CFMs do extrato etanólico de *E. involucrata* frente às espécies de *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. dubliniensis* estão descritos na Tabela III.

De acordo com os dados obtidos, o extrato etanólico de *E.involucrata* não apresentou atividade inibitória frente às cepas em estudo até a concentração máxima testada (CIMs e CFM > 2000 µg/mL) (Tabela III e IV).

Tabela III - Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para o extrato etanólico de *E. involucrata* frente à *Candida* spp.

Microrganismos	CIM (µg/mL)
Candida albicans ATCC 1405	>2000 µg/mL
Candida glabrata isolado clínico	>2000 µg/mL
Candida parapsilosis AT CC22019	>2000 µg/mL
Candida dubliniensis isolado clínico	>2000 µg/mL

Faixa de concentração testada: 2000 µg/mL – 3,906 µg/mL.

Tabela IV – Concentração Fungicida Mínima (CFM) obtida para o extrato etanólico de *E. involucrata* frente à *Candida* spp.

Microrganismos	CFM (µg/mL)
Candida albicans ATCC 1405	>2000 µg/mL
Candida glabrata isolado clínico	>2000 µg/mL
Candida parapsilosis AT CC22019	>2000 µg/mL
Candida dubliniensis isolado clínico	>2000 µg/mL

Faixa de concentração testada: 2000 µg/mL – 3,906 µg/mL.

DISCUSSÃO

Neste estudo realizado com o extrato etanólico de *E. involucrata,* o mesmo não se mostrou ativo, com resultados de CIMs maiores que 2000 µg/mL para os microrganismos testados. Holetz et al. (2002) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como boa atividade valores de CIM menores do que 100 µg/mL; moderada atividade para CIM entre 100 e 500 µg/mL; fraca atividade valores de CIM entre 500 e 1000 µg/mL e valores de CIM maiores do que 1000 µg/mL o extrato é considerado inativo.

Baseado no que é preconizado por estes autores, pode-se inferir que os resultados de CIM obtidos para o extrato etanólico de *E. involucrata* frente à *C. albicans (*2000 µg/mL), *C.glabrata* (2000 µg/mL) e *C. parapsilosis* (2000 µg/mL) e *C. dubliniensis* (2000 µg/mL), não foram promissores (HOLETZ et al. 2002) frente a estes microrganismos e nas concentrações em que foram testadas. Adicionalmente sugere-se a continuidade dos estudos frente a outros microrganismos e estudos de associação com antifúngicos.

Estudos realizados com outras espécies do gênero *Eugenia* frente a diversos microrganismos revelam seu potencial antimicrobiano (HOLETZ et al. 2002, AURACCHIO et al. 2006, FIUZA et al. 2008, BEZERRA et al. 2012, VICTORIA et al. 2013).

O óleo essencial de *E. uniflora* apresentou efeito inibitório utilizando a técnica de microdiluição em caldo frente a diversos microrganismo como *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, *C. krusei, C. tropicalis,* e *C. parapsilosis* (HOLETZ et al. 2002). Já Fiúza et al. (2008) relatou a sensibilidade de *C. albicans* a essa mesma espécie do gênero *Eugenia*, entretanto utilizando extrato bruto das folhas como material de análise. Da mesma forma, Victória et al. (2013), demonstraram que o óleo essencial das

folhas de *E. uniflora L*., além de exercer atividade antimicrobiana frente *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, também apresentou ação antifúngica frente *C. albicans, C. globosa, C. guillermondi, C. parapsilosis e C. lypolytica*.

Já no estudo de Auricchio et al. (2006), as bactérias *Staphylococcus aureus, Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* mostraram-se sensíveis à ação do extrato de *E. uniflora*. Tal atividade foi atribuída à presença de taninos, os quais são capazes de se complexar com macromoléculas dos microrganismos (AURICCHIO 2006).

Estudo realizado por de Tiwari et al. (2009) revelou a atividade antimicrobiana dos extratos, frações e compostos isolados das folhas e caules de *Eugenia pyriformis* Cambess. As análises foram realizadas utilizando as técnicas da bioautografia e microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O teste da bioautografia permitiu detectar atividade antimicrobiana nos extratos, frações e compostos isolados de *E. pyriformis* frente a cepas de microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos leveduriformes. (HOLETZ et al. 2002, TIWARI et al. 2009).

Alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana da espécie *E. involucrata* também já foram relatados na literatura. Vechi (2015) avaliou a atividade antifúngica do extrato bruto metanólico e das frações clorofórmio e acetato de etila de *E. involucrata* pela técnica de microdiluição em caldo. Este autor considerou como moderada atividade a ação exibida pelo extrato frente a *S. aureus* (CIM 125 µg/mL), *C. albicans* (CIM 125 µg/mL) e *E. coli* (CIM 500 µg/mL).

Em outro estudo realizado por Cipriani (2016) realizou-se a extração de *E. involucrata* pelo método de maceração com etanol 70% e posteriormente o fracionamento deste extrato, obtendo assim a fração insolúvel, aquosa, diclorometano, acetato de etila e butanol. Foi avaliada a atividade antibacteriana frente a bactérias com parede celular (*S. aureus, P. aeruginosa* e *E. coli*) e sem parede celular (*Mycoplamsa hominis, Mycoplasma genitalium, Mycoplamsa capricolum* e *Mycoplasma pneumonie*), no entanto, apenas a fração acetato de etila se mostrou moderadamente ativa (CIM 500 µg/mL) frente a cepas de *E. coli.*

Também existem estudos, os quais relatam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. involucrata* obtido por aparelho do tipo Clevenger. Toledo (2018) demonstrou atividade para todas as bactérias gram-positivas testadas (*S. epidermidis, E. faecalis, B. subtilis e S. aureus)* e também para a levedura *C. albicans.* Ainda no mesmo estudo, foi relatada a atividade antimicrobiana de extratos de *E. involucrata* obtidos a partir da extração com diferentes tipos de solventes, sendo eles: metanol, etanol, acetona, acetato de etila, hexano, diclorometano e água destilada. Segundo os autores, os extratos caracterizados com atividade antimicrobiana elevada foram os extraídos com metanol e etanol (TOLEDO 2018), sugerindo assim que, os compostos ativos foram extraídos pelos solventes mais polares.

No presente trabalho o extrato etanólico da espécie *E. involucrata* não obteve boa atividade, no entanto, em outros estudos aqui citados as amostras de extrato, óleo essecial e frações obtidas dessa mesma espécie vegetal obtiveram atividade antimicrobiana. Cabe destacar que existem diversos fatores os quais podem interferir na determinação da CIM de extratos vegetais. Dentre estes, pode-se destacar a época de coleta da planta, o pH do meio de cultura e as condições de incubação dos microrganismos utilizados no teste (OSTROSKY 2008).

Sendo assim, embora os resultados aqui obtidos não sejam considerados promissores, os relatos das propriedades antimicrobianas de outras espécies do gênero *Eugenia* e também da própria espécie *E. involucrata,* aliado às vantagens da utilização de fármacos provenientes de fontes naturais, justificam a continuidade dos estudos sobre a atividade antimicrobiana do extrato bruto de *E. involucrata* frente a outros microrganismos*.* Além disso, torna-se importante a pesquisa da toxicidade de *E. involucrata*. Estudos que possam avaliar a composição química de *E. involucrata* de forma detalhada também são de fundamental importância para justificar as análises realizadas até o momento sobre as atividades farmacológicas.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Renato Záchia, da UFSM pela realização da identificação da planta e ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM) por ofertar os microrganismos para elaboração dos testes.

CONCLUSÕES

O extrato etanólico de *E. involucrata* não apresentou atividade inibitória e fungicida frente às cepas de *C. albicans*, *C. glabrata, C. albicans* e *C. parapsilosis* até sua concentração máxima testada (CIMs e CFMs >2000 µg/mL). Sendo assim, outros estudos são de fundamental importância para o conhecimento de sua ação frente a outros microrganismos, bem como investigação de sua toxicidade e compostos ativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURICCHIO, T. et al. 2006. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. Latin American Journal of Pharmacy, v.26 , n.1.

BAGINSK, M. et al.2005. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, apolyene macrolide antifungal antibiotic. Acta biochimica Polonica, 2005, v.52, n.3, p 655-658.

BARATA-SILVA, A.W et al. 2005. Potencial de utilização de espécies arbóreas medicinais no Rio Grande do Sul. Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal - ISSN 1678-3867. Publicação ciêntífica da faculdade de agronomia e engenharia florestal de garça/FAEF.

BEZERRA, N. A et al. 2012. Avaliação da atividade antimicrobiana de Eugenia uniflora. L. ISSN 1983-4209, v.9, n.02.

CASTRO, D. L. L. 2006. “Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: Um enfoque qualitativo no distrito federal”. Pós- graduação Lato Sensu, Universidade de Brasília.

Children. Jornal de Pediatria. v.93.n.2. p.165-171.

CIPRIANI, 2016. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade hipoglicemiante, antioxidante, anticolinesterásica e antimicrobiana das folhas de *Eugenia involucrata* (Myrtaceae). Dissertação (Mestrado em Química) -

Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau.

CLSI/NCCLS. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A3, vol. 28. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.

COLOMBO, A. L, GUIMARÃES, T. 2003. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp**.** Rev Soc Bras Med Trop. 36:p.599–607.

ELLIS, D.2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.49, n.1, p 7-10.

FIÙZA, T. S. et al. 2008. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Revista eletrônica de Farmácia*, v. 5, n. 2.

FIÚZA, T.S et al.2009. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of Eugenia uniflora L. leaves. Rev. Ciên. Farm. Básica Apl., v.29, n.3, p.245-250.

HOLETZ, F. B. et al. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 7, p.1027-1031.

MOTTA et al. 2016. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized

OSTROSKY et al. 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.2, p.301-307.

PEREIRA, F. O.2009. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor sobre dermatófitos do gênero *Trichosphyton.* Dissertação de Mestrado. João Pessoa.

PFALLER, M. A et al. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocands antifungal agents. Journal of Clinical Microbiology, v.37, n.3, p.870-872.

PFALLER, M. A, DIEKEMA, D. J. 2007.Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin. Microbiol. Rev. 20. p.133-163.

PFALLER, M. A. et al.2006. Global surveillance of in vitro activity of micafungin against *Candida*: acomparison with caspofungin by CLSI recommended methods. J. Clin. Microbiol., 44: p.3533–3538.

PFALLER, M.A., DIEKEMA, D.J. 2004 Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin. Microbiol. Infect, v.10. n.1.p.11-23.
por *Candida* e Abordagem Terapêutica. Revista Portuguesa de Farmacoterapia p.161-168.
SIDRIM, J. J. C, ROCHA, M. F. G. 2004. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, p.21- 266.
TIWARI, B. K. et al. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Davis, v. 57, n. 14, p. 5987-6000.
TOLEDO, 2018. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* DC. Dissertação (Mestrado em Conservação e Manejo de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel
VECHI, 2015. Potencial biológico e composição química das folhas de *Eugenia involucrata* (cerejinha-do-mato). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, SC.
VICTORIA, F. et al. 2013. Essential of the leaves of Eugenia Uniflora L.: Antioxidant and antimicrobial properties. Food and chemical toxicology.p.2668-2674.
VIEIRA F, NASCIMENTO T. 2017. Resistência a Fármacos Antifúngicos
WARNOCK, D. W.2007. Trends in the epidemiology of invasive fungals infections. Jpn. J. Med. Mycol. p.1-12.
ZOMORODIAN, K. et al.2011. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med. Mycol. 49, p.208–211.