

Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais

Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from nosocomial infections

RIALA6/1241

Fernando de Sá SILVA^{1*}, Tatiane Morais FERREIRA², Guilherme Rodrigues TEODORO², Anna Carolina Borges Pereira da COSTA², Aguida MARIA³, Milton BELTRAME JUNIOR⁴, Marcos José SALVADOR⁵, Claudete Rodrigues de PAULA⁶, Sônia KHOURI²

*Endereço para correspondência: Laboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, Butantan, São Paulo, SP, Brasil CEP: 05503-900, e-mail: silvafs@gmail.com

¹Laboratório de Genética, Instituto Butantan

²Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brasil

³Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Taubaté, Taubaté, SP, Brasil

⁴Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos, SP, Brasil

⁵Faculdade de Farmácia, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

⁶Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 03.08.2009 – Aceito para publicação: 07.12.2009

RESUMO

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* tem sido alvo de vários estudos em função do potencial antimicrobiano. Neste estudo, a atividade desse componente foi investigada em cepas do gênero *Candida* isoladas de infecções hospitalares. Para a condução do estudo, foram analisadas 24 isolados de *Candida albicans* e 15 isolados de *Candida tropicalis*, originados de pacientes com suspeitas de infecção hospitalar e uma cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231, por meio da técnica de difusão em ágar. O óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade antifúngica em 100% dos isolados a partir da concentração de 25% (v/v), o que indica sua ação positiva sobre as cepas hospitalares. Sugere-se a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos desse componente para avaliar a possível aplicação clínica.

Palavras-chave. *Candida* spp, capim limão, *Cymbopogon citratus*, atividade antifúngica, óleo essencial.

ABSTRACT

The antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil was assessed by means of agar diffusion technique on 24 *Candida albicans* isolates and 15 *Candida tropicalis* isolates originated from patients with suspected nosocomial infection, and one *Candida albicans* ATCC 10231 standard strain. *Cymbopogon citratus* essential oil showed antifungal activity on 100% of the isolates which were analyzed from 25% (v/v) on concentrations, indicating its effective activity on nosocomial microorganisms.

Key words. *Candida* spp, lemongrass, *Cymbopogon citratus*, antifungal activity, essential oil.

INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, observou-se um aumento da incidência de infecções sistêmicas graves por fungos oportunistas devido à resistência destes frente às atuais classes de antifúngicos, o que está correlacionado com o uso indiscriminado dos mesmos. Além do mais, os antifúngicos comumente usados causam efeitos adversos aos pacientes, que incluem hipersensibilidade, reações alérgicas e imunossupressão¹. Estas incidências são também influenciadas por algumas doenças tais como câncer, diabetes e AIDS^{2, 3, 4, 5, 6}.

Dentre os fungos oportunistas, o grupo que abrange *Candida* spp., foi considerado o quarto maior isolado em infecção sanguínea nosocomial registrado no Canadá, EUA, Europa e América Latina⁷. Este estudo, realizado entre 1997 a 1999, o qual abrangeu 71 centros médicos, mostrou predominância de *C. albicans* entre 45% a 60% em todas as infecções sanguíneas causadas por *Candida* spp. *Candida tropicalis* foi colocada como a segunda espécie mais isolada, seguida por *Candida parapsilosis*, na América Latina e em alguns centros médicos da Europa⁷. Estudos recentes nestas regiões evidenciaram que esta incidência permanece pouco alterada^{2, 8, 9, 10, 11}; valores semelhantes têm sido observados em hospitais no Brasil e em alguns países asiáticos^{4, 5, 12, 13, 14, 15}.

Entre os antifúngicos frequentemente usados para o tratamento das infecções causadas por *Candida* spp., estão os derivados de poliênicos, a 5-fluorocitosina e os derivados azólicos¹⁶. Os agentes antifúngicos têm como principal objetivo atuar unicamente contra fungos patogênicos, todavia, devido às semelhanças celulares também são prejudiciais às células humanas¹⁷. Atualmente, além da toxicidade promovida pelos antifúngicos, um número cada vez maior de cepas de várias espécies de *Candida* tem adquirido resistência a estes fármacos^{5, 7, 11, 13, 14, 18}.

Com isso, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com produtos de origem vegetal na busca de uma alternativa mais eficiente e menos tóxica para o tratamento das infecções fúngicas¹⁹. Entre as espécies vegetais, destaca-se o *Cymbopogon citratus* (*C. citratus*) cujo óleo essencial obtido das folhas tem apresentado ótima atividade antifúngica. Pertencente à família Poaceae e originária da Índia, *C. citratus* (D.C.) Stapf é conhecido popularmente no Brasil como capim-limão ou *lemongrass* nos países de língua inglesa²⁰. É uma erva perene, ereta, de 0,60 a 2 m de altura, com folhas aromáticas, estreitas, longas e paralelinérvias partindo da base^{20, 21}. Suas folhas há muito

tempo, são consumidas pela população na forma de chá ou infusão. O seu principal emprego está relacionado no alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, flatulência, no tratamento de insônia, nervosismo, além de efeitos antitérmico, antiespasmódico e diurético^{22, 23}.

A atividade antifúngica de *C. citratus* está relacionada ao óleo essencial, princípio odorífero da planta, contido em suas folhas. No entanto, são poucos os trabalhos existentes em relação à sua ação antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*, especialmente aquelas isoladas de pacientes hospitalizados. Contudo, tem sido relatado que pequenas concentrações do óleo essencial promovem excelentes efeitos em cepas de distintas espécies de *Candida*¹⁹. Mishra e Dubey²⁴, demonstraram que o óleo essencial foi ativo contra 47 espécies de fungos, incluindo *Candida* spp. Resultados promissores contra fungos filamentosos e bactérias também foram descritos^{25, 26}.

Diante das perspectivas oferecidas pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*, e frente ao aumento da resistência e incidência das infecções hospitalares por *Candida*, há grande interesse em desenvolver novos antifúngicos eficientes com baixa toxicidade e custo acessível. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* em cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Folhas de *Cymbopogon citratus* foram coletadas no Horto Medicinal da Universidade de Taubaté (UNITAU), Taubaté – SP, no período da manhã, em março de 2005. As folhas foram cortadas à altura entre 20 a 30 cm a partir do solo e protegidas da luz²⁷. A espécie foi identificada no Núcleo de Estudos Botânicos do Centro de Estudos da Natureza (CEN), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), São José dos Campos – SP.

Extração do óleo essencial

O processo de obtenção do óleo essencial, realizado no Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – UNIVAP, seguiu o método direto por destilação com arraste de vapor²⁸. Folhas frescas (100 g) de *C. citratus* foram picadas e imersas em 500 mL de água destilada. O óleo foi separado

da água utilizando acetato de etila (E7770, Sigma) e seco com sulfato de magnésio anidro (M7506, Sigma) à temperatura ambiente, até formar precipitado. A solução foi filtrada e evaporada para a remoção do solvente. Logo após, o óleo foi pesado e armazenado a 4°C.

Análise Química

A análise por cromatografia gasosa (CG) foi realizada utilizando um cromatógrafo de gás Shimadzu GC-17A com detector FID, no modo de injeção *split*. Uma coluna capilar Durabond-DB5 (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) foi operado a 60 °C por 3 min, programado de 60°-220 °C a 5 °C/min e mantido em 220 °C por 5 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL/min) e a temperatura do injetor foi 250 °C. A porcentagem relativa de componentes individuais foi obtido baseado nas áreas dos picos obtidos pela integração eletrônica sem o fator de correção de reposta FID. A análise CG/EM (70 eV) foi realizada utilizando o espectrofotômetro Varian Saturn 2000 equipado com uma coluna de capilar CP-Sil-8CB (30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) sobre as mesmas condições relacionadas acima. Os componentes do óleo essencial foram identificados pela comparação de seus índices de retenção (relativo aos n-alcenos) e espectros de massa com os dados encontrados na literatura²⁹. Após a identificação, os dados foram armazenados no banco de dados de espectrometria (NIST 1998).

Teste antimicrobiano

A atividade antimicrobiana foi feita pelo método de difusão em ágar (cavidade/placa) modificado^{30, 31, 32}. Foram avaliadas 24 amostras de leveduras das espécies *C. albicans* e 15 de *C. tropicalis* pertencentes ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), coletadas entre 2002 e 2003, apenas de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar no Hospital Universitário de Taubaté (HUT) (Tabelas 1 e 2). A cepa padrão utilizada foi *C. albicans* ATCC 10231. Os inóculos de 10⁶ UFC/mL de *Candida* foram semeados em meio ágar Dextrose Sabouraud (Difco, Detroit, USA). O inóculo de cada cepa testada foi padronizado de acordo com Clinical and Laboratory Standard Institute³³. Subsequentemente, alíquotas de 20 µL de cada concentração de solução testada foram aplicadas em poços com 5 mm de diâmetro. As soluções do óleo essencial foram preparadas a partir do óleo bruto diluído nas concentrações de 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v) em óleo vegetal (óleo de amêndoas, LECLERC-LTDA) e

mantidas a 4°C. Após a incubação a 37°C por 48 h, foi realizada a medição dos diâmetros, em milímetros (mm), dos halos de inibição. Nitrato de miconazol (20 mg/mL – concentração utilizada no mercado) foi utilizado como controle positivo; e o óleo vegetal (óleo de amêndoas) como controle negativo, no qual nenhum efeito inibitório foi observado (dado não mostrado). Os testes foram realizados em triplicata para cada micro-organismo, sendo o resultado final determinado pela média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição, de cada concentração do *C. citratus* e controle positivo, entre as cepas da mesma espécie. Foi considerado a distribuição normal sendo o desvio padrão $\sigma_{(n-1)}$ ^{19,34}. A sensibilidade das cepas testadas frente ao óleo de *C. citratus* foi atribuída aquelas cujo halos de inibição ficaram acima de 6 mm e ausentes de colônias micro-satélites no seu interior.

RESULTADOS

O processo de extração do óleo essencial, por destilação com arraste de vapor, rendeu 0,57% de óleo a partir de 100 g de folha frescas de *C. citratus*. Seus constituintes majoritários foram detectados pela análise de CG/EM, que mostrou a presença de α -citral (28,03%), β -citral (12,02%) e sulcatone (4,8%). Os resultados dos testes de sensibilidade das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente ao óleo essencial estão organizados respectivamente nas Tabelas 1 e 2, e a comparação do grau de sensibilidade entre ambas as cepas está demonstrada na Figura 1. Foi observada atividade antifúngica em todas as cepas, de ambas as espécies de *Candida* a partir da concentração de 25% do óleo. Contudo, a menor concentração testada do óleo (10%) demonstrou atividade contra 48% das cepas de *C. albicans* e 20% das cepas de *C. tropicalis*.

Considerando os resultados a partir da concentração de 25% onde todas as cepas, de ambas as espécies, apresentaram sensibilidade ao óleo, ocorreram variações nos halos de inibição, principalmente nas cepas de *C. albicans*, sendo melhor observado a partir da concentração de 50%. Na maior concentração testada (60%) ocorreu inibição apresentando halos entre 17 a 38 mm, que foi também observado no controle positivo, com halos entre 28 a 50 mm. Em relação a *C. tropicalis* as variações dos halos de inibição foram menos expressivos, como pode ser observado a partir da concentração de 25% o desvio padrão não excedeu a ± 2 mm (Tabela 2).

Tabela 1. Halos de inibição (mm) formados pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra 24 cepas hospitalares de *C. albicans* e uma cepa padrão ATCC 10231

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 mL						Controle Positivo - 20 mL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10%	15%	25%	35%	50%	60%	
ATCC 10231	10	13	20	26	28	30	37
Ca08	0	8	13	15	17	17	28
Ca25	0	12	16	19	21	30	34
Ca27	0	0	18	22	24	24	45
Ca29	0	0	15	20	21	23	42
Ca30	0	0	16	19	21	23	39
Ca31	0	0	15	19	26	29	30
Ca34	0	0	19	22	24	27	32
Ca35	0	0	16	18	21	21	40
Ca46	0	0	18	25	32	38	50
Ca55	0	0	17	21	34	36	45
Ca56	0	0	16	18	21	23	36
Ca61	0	0	16	17	19	21	41
Ca64	0	0	17	21	24	26	40
Ca65	11	13	16	26	26	30	37
Ca69	10	12	19	21	28	32	36
Ca70	10	12	17	23	26	30	36
Ca72	8	12	17	19	24	30	32
Ca73	11	13	19	22	24	27	33
Ca74	9	11	18	19	23	25	30
Ca85	10	12	19	23	24	25	35
Ca86	8	12	16	22	27	28	43
Ca87	10	13	19	24	30	30	45
Ca91	8	11	19	21	23	24	33
Ca104	10	12	17	23	30	31	35
Média	5	7	17	21	25	27	37
Desvio Padrão	±5	±6	±2	±3	±4	±5	±6

Resultados numéricos em mm.

Tabela 2. Halos de inibição (mm) formados pela ação antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* contra 15 cepas hospitalares de *C. tropicalis*

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 mL						Controle Positivo - 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10%	15%	25%	35%	50%	60%	
Ct05	0	0	13	15	22	22	35
Ct06	10	11	14	18	20	22	33
Ct33	0	0	13	16	18	20	35
Ct37	8	9	13	16	19	20	31
Ct57	0	0	12	15	17	18	29
Ct58	0	10	14	18	20	21	33
Ct62	0	0	13	17	24	24	31
Ct66	0	8	11	13	15	16	29
Ct67	0	9	13	15	17	18	30
Ct71	0	8	14	16	18	22	27
Ct81	0	0	12	14	17	21	33
Ct82	0	8	11	14	17	19	33
Ct83	7	8	12	14	18	19	32
Ct95	0	0	13	16	20	22	32
Ct97	0	8	13	16	18	19	33
Média	2	5	13	16	19	20	32
Desvio Padrão	±3	±5	±1	±1	±2	±2	±2

Resultados numéricos em mm.

A cepa de referência *C. albicans* (ATCC 10231) apresentou halos maiores que os valores da média de todos os halos das cepas de *C. albicans*. No entanto, algumas cepas de isolados hospitalares apresentaram maior sensibilidade ao óleo que a cepa de referência.

O nitrato de miconazol (20 mg/mL) foi utilizado como controle positivo contra as cepas testadas, produzindo halos de inibição entre 27-45 mm (Tabelas 1 e 2); e como controle negativo foi utilizado o óleo vegetal de amêndoas, sendo que nenhum efeito inibitório foi observado (dados não mostrados).

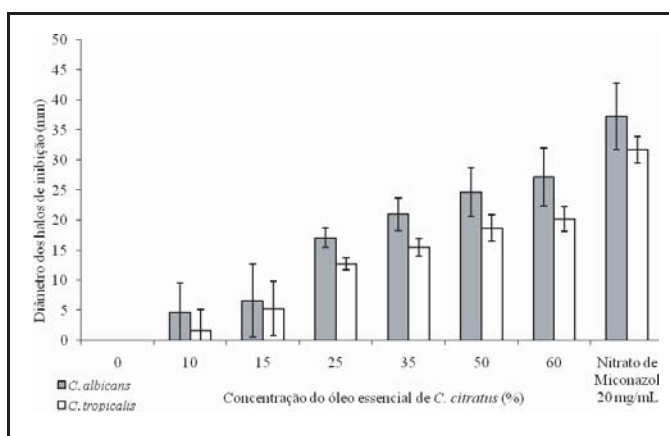


Figura 1. Média dos halos de inibição (em mm) das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* frente a 20 µL do óleo essencial de *C. citratus* em diferentes concentrações e o controle positivo nitrato de miconazol a 20 mg/mL.

DISCUSSÃO

Os óleos essenciais podem ser avaliados de acordo com suas características físico-químicas como: teor ou rendimento, estabilidade e quantificação de constituintes químicos. Estas características variam e dependem diretamente do local onde a planta é cultivada, sendo influenciadas dentre vários fatores pelo clima, solo, tratamentos culturais e exposição à luz, dependendo também das suas características genéticas²¹.

O óleo essencial *C. citratus*, extraído pelo método de destilação com arraste de vapor, teve um rendimento de 0,57% das folhas frescas. Este resultado está de acordo com Akisue et al.²², que obtiveram um rendimento entre 0,46% a 0,86%; e Mishra e Dubey²⁴ que também chegaram a resultados semelhantes com rendimentos entre 0,29% e 0,64%; tal variação para ambos os trabalhos dependeu da época do ano em que as folhas foram coletadas.

Apesar das poucas publicações referentes à ação antifúngica do óleo contra cepas de *Candida* de origem hospitalar, os resultados do presente trabalho foram compatíveis às referências existentes. Lima e Farias¹⁹ demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial de *C. citratus*, o qual inibiu o crescimento de todas as cepas hospitalares do gênero *Candida* testadas, entre estas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

Considerando os resultados a partir da concentração de 25% onde todas as cepas, de ambas as espécies, apresentaram sensibilidade ao óleo, ocorreram variações nos halos de inibição, principalmente se tratando de *C.*

albicans, onde tais variações, de acordo com os desvios padrões, aumentaram com o aumento das concentrações do óleo (Tabela 1), enquanto em relação à *C. tropicalis*, estas variações foram percebidas em menor intensidade. Variações semelhantes foram observadas por Lima e Farias¹⁹ em um experimento empregando o método de disco de papel, onde os halos mediram entre 20 a 40 mm para *C. albicans* e de 20 a 32 mm para *C. tropicalis*. Nossos resultados estão em acordo com a literatura a qual sugere que, não apenas cepas de *C. albicans*, mas também cepas de *C. tropicalis*, isoladas de infecções nosocomiais, possuem diferentes graus de susceptibilidade.

Outros trabalhos mostram bons resultados relativos à atividade antifúngica do óleo essencial de *C. citratus*. Onawunmi³⁵ obteve satisfatório efeito antifúngico contra *Candida* spp., tendo halos de inibição numa média de 26 mm para cepas selvagens de *C. albicans* e 32 e 53 mm para cepas padrões de *C. albicans* e *C. pseudotropicalis*, respectivamente. Onawunmi³⁵ seguido por Mishra and Dubey²⁴ sugeriram que o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *C. citratus* é devido ao citral, componente majoritário do óleo que demonstrou admirável atividade antifúngica. Em 1998, Carmo et al.³⁶ analisaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus*, contra 10 cepas de *C. albicans*, isoladas de pacientes com AIDS, e obtiveram inibição em 90% das cepas. Schuck et al.³⁴ também mostram resultados promissores, já que a ação do óleo essencial, frente a cepas padrões de *Candida*, foi superior a nistatina usada como controle positivo.

Numa última avaliação, a Figura 1 mostra a comparação das médias dos halos de inibição formados, pelas concentrações do óleo essencial para as cepas de ambas as espécies. Nota-se uma tendência de saturação da atividade antifúngica do óleo essencial com o aumento da concentração, tendendo a ficar abaixo do valor da média dos halos de inibição do controle positivo. No entanto, isso não indica que o potencial antifúngico do óleo seja inferior, sendo necessário realizar testes com concentrações mais elevadas e, futuramente, testes toxicológicos, já que se deve levar em consideração que a maioria dos antifúngicos no mercado causam efeitos colaterais.

CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou bons resultados da ação antifúngica do óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* em cepas hospitalares de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Todas as cepas, de ambas as espécies, foram

inibidas a partir da concentração de 25% do óleo essencial. Dessa forma, sugere-se futuros estudos contra outros fungos patogênicos, além de estudos farmacológicos e toxicológicos para uma futura aplicação clínica.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer Carlos Magno da Costa Maranduba e Lisley Inata Mambelli, pesquisadores do Instituto Butantan, à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Mukherjee PK, Saritha GS, Suresh B. Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. *Phytother Res* 2002; 16 (7): 692-5.
2. Jordà-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, Palomar M, Nolla-Salas J, León MA, et al. Risk factors for candidemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 2007; 50 (4): 302-10.
3. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sngül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 85 (2/3): 231-5.
4. Kung HC, Wang JL, Chang SC, Wang JT, Sun HY, Hsueh PR, et al. Community-onset candidemia at a university hospital, 1995-2005. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40: 355-63.
5. Shen YZ, Qi TK, Ma JX, Jiang XY, Wang JR, Xu QN, et al. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. *Mycoses* 2007; 50: 475-80.
6. Xie GH, Fang XM, Fang Q, Wu XM, Jin YH, Wang JL, et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Crit Care [serial online]* 2008; 12 (1): Available from: URL: <http://ccforum.com/content/12/1/R5>
7. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (9): 3254-9.
8. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, D'enfert C, Fagon JY, Candirea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 2008; 34 (2): 292-9.
9. Horn DL, Fishman JA, Steinbach WJ, Anaissie EJ, Marr KA, Olyaei AJ, et al. Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59 (4): 407-14.
10. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26 (8): 541-7.
11. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, Jacobsen MD, Wright P, Whyte JA, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1066-75.
12. Colombo AL, Nucci M, Salomão R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34 (4): 281-6.
13. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (8): 2816-23.
14. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57 (4): 399-404.
15. Lee JS, Shin JH, Lee K, Kim MN, Shin BM, Uh Y, et al. Species distribution and susceptibility to azole antifungals of *Candida* bloodstream isolates from eight university hospitals in Korea. *Yonsei Med J* 2007; 48 (5): 779-86.
16. Alves SH, Lopes JO, Cury AE. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos. Por que, quando e como realizar. *NewsLab* 1997; 25: 140-8.
17. Trabulsi LR, Alterthum, F. *Microbiologia*. 4a ed. São Paulo, São Paulo: Atheneu; 2004.
18. Hazen KC, Baron EJ, Colombo AL, Girmenia C, Sanchez-Souza A, Palacio A, et al. Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (12): 5623-32.
19. Lima EO, Farias NMP. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. *R Bras Ci Saúde* 1999; 3(1/3): 51-64.
20. Castro LO, Ramos RLD. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: FEPAGRO; 2003.
21. Ortiz RS, Marrero GV, Navarro ALT. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (caña santa). *Rev Cubana Plant Med* 2002; 7 (2): 89-95.
22. Akisue G, Akisue MK, Silva RJ, Andaluz MI. Padronização da droga e do extrato fluído de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Lecta* 1996; 14 (2): 109-19.
23. Cortez LER, Jacomossi E, Cortez DAG. Levantamento das plantas medicinais utilizadas na medicina popular de Umarama, PR. *Arq Ciênc Saúde Unipar* 1999; 3 (2): 97-104.
24. Mishra AK, Dubey NK. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (4): 1101-5.
25. Pontes ZBV. Atividade antifúngica de rodutos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon* Behrend [Tese de doutorado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2002. 189 pp.
26. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 213-20.
27. Martins PM. Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e da composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) [Tese de Magister Scientiae]. Viçosa, Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 77 pp.

28. Fortes CC, Dalston RCR. Manual de química orgânica experimental. 1a ed. Brasília: Universa; 2003.
29. Adams RP. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4 th ed. Illinois: Carol Stream; 1995.
30. Okeke MI, Iroegbu CV, Eze EN, Okoli AS, Esimone CO. Evaluation of extracts of the roots of *Landolphia oweeunce* for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2001; 78 (2/3): 119-27.
31. Cole MD. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. *Biochem Syst Ecol* 1994; 22 (8): 837-56.
32. Grove DC and Randall WA. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia Inc; 1955.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Pennsylvania: NCCLS; 2003.
34. Schuck VJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. *Rev Bras Ciên Farm* 2001; 37 (1): 45-9.
35. Onawunmi GO. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. *Int J Crude Drug Res* 1989; 27 (2): 121-6.
36. Carmo CME, Lima EO, Milan EP. Atividade antifúngica e extratos e óleos essenciais contra *Candida albicans* isolada de pacientes com AIDS. *Rev Bras Farm* 1998; 79 (3/4): 108-11.