

VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS E ÓLEO DE EUCALIPTO NO CONTROLE *in vitro* de *Aspergillus niger*.

VERIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS Y ACEITE DE EUCALIPTO PARA EL CONTROL DE *Aspergillus niger*.

in vitro VERIFICATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AND EUCALYPTUS OIL TO CONTROL *Aspergillus niger*.

Danila Fernanda Rodrigues Frias ¹, Dora Inês Kozusny-Andreani ²
Recibido El 18 de marzo de 2009 y aceptado el 20 de noviembre de 2009

Resumo

Este trabalho objetivou avaliar atividade antifúngica de diferentes extratos de plantas e óleo de eucalipto no controle de *Aspergillus niger*. As plantas utilizadas para a preparação dos extratos foram: folhas de arruda (*Ruta graveolens*), citronela (*Cymbopogon nardus*), tiririca (*Cyperus rotundus*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), graviola (*Annona muricata*), fruta do conde (*Annona* spp), manga (*Mangifera indica*), romã (*Punica granatum*), folhas e flores de calêndula (*Calendula* spp), e flores e folhas de primavera (*Bougainvillea glabra*). Para a determinação da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto foram adicionados ao meio Sabouraud dextrose (Difco), As placas inoculadas foram mantidas em incubadora a temperatura de $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ até o desenvolvimento do fungo na placa controle sem adição do extrato. Pode-se concluir que o óleo de eucalipto apresentou atividade antifúngica contra o *Aspergillus niger* na concentração de 340 μl , porém, todos os extratos testados não surtiram nenhum tipo de efeito inibitório, ao contrário, os extratos de folhas e flores de primavera, de folhas de calêndula, tiririca e eucalipto induziram o desenvolvimento do fungo.

Palavras-chave

Aspergillus niger; plantas, óleo de eucalipto, concentração inibitória mínima.

Resumen

El hongo *Aspergillus niger* fue usado para este experimento. Las plantas usadas fueron hojas de *Ruta graveolens*, *Cymbopogon nardus*, *Cyperus rotundus*, *Tagetes minuta*, *Eucalyptus* spp, *Annona muricata*, *Annona* spp, *Mangifera indica*, *Punica granatum*, *Calendula* spp and *Bougainvillea glabra*. Para la determinación de la actividad antimicótica de los extractos y del aceite de eucalipto, el medio de cultivo Dextrosa de Sabouraud (Difco) fue usado; el hongo fue inoculado cuando el medio había solidificado. Los platos inoculados se incubaron a $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ grados de temperatura hasta que se presento crecimiento en los controles. En conclusión, el aceite de eucalipto mostró actividad antimicótica contra *Aspergillus niger* a una concentración de 340 μl , sin embargo ninguno de los extractos tubo algún efecto inhibitorio. Por otro lado, los extractos de *Eucalyptus* spp, hojas de *Calendula* spp y hojas y flores de *Bougainvillea glabra* y *Cyperus rotundus* indujeron desarrollo de *A. niger*.

Palabras clave

Aspergillus niger; plantas, aceite de eucalipto, concentración inhibitoria mínima.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Doutoranda. Via de Acesso: Prof. Paulo Donato Castellane, S/N, CEP: 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. E-mail: danilafrias@yahoo.com.br

² Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO), Laboratório de Microbiologia. Docente e Pesquisadora. Estrada Projetada F-1, S/N - Fazenda Santa Rita, CEP: 15600-000, Fernandópolis, São Paulo, Brasil. E-mail: doraines@terra.com.br

Abstract

Saprobe fungus *Aspergillus niger* was used in the experiment. The plants used were leaves of *Ruta graveolens*, *Cymogopogon nardus*, *Cyperus rotundus*, *Tagetes minuta*, *Eucalyptus* spp, *Annona moricata*, *Annona* spp, *Mangifera indica*, *Punica granatum*, *Calendula* spp and *Bougainvillea glabra*. Culture medium Sabouraud dextrose (Difco) was used for determination of antifungal activity of the extracts and eucalyptus oil. The fungus was inoculated once the medium was solidified. The inoculated dishes were maintained incubator at a temperature of $36 \pm 0, 5^{\circ}\text{C}$ until the development of the fungus in the controls. In conclusion, eucalyptus oil showed antifungal activity against *Aspergillus niger* at a MIC of 340 μl , however none of tested extracts had any inhibitory effect. On the other hand, extracts of *Eucalyptus* spp, leaves of *Calendula* spp and leaves and flowers of *Bougainvillea glabra* and *Cyperus rotundus* induced *A. niger* development.

Keywords

Aspergillus niger, plants, eucalyptus oil, minimal inhibitory concentration.

Introdução

As dermatofitoses ou dermatomicoses são infecções das estruturas queratinizadas como unhas, pêlos e camada córnea da pele causadas por fungos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (14, 25, 33), que incluem cerca de quarenta espécies, das quais somente algumas, pertencentes aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são usualmente as causas de dermatofitose em animais domésticos(3, 14, 25). Os animais servem como reservatórios de dermatófitos zoofilicos e suas infecções possuem importância zoonótica(3).

A dermatofitose é uma doença extremamente contagiosa, não apenas entre os animais, mas também dos animais para o homem, em contato com gatos, cães, cavalos entre outros, caracterizando-se assim, uma zoonose (14, 20, 25, 33). Os dermatófitos zoofilicos como *M. canis*, *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* constituem em importantes agentes de tinhas em humanos (3).

Além dos dermatófitos, outros fungos tem sido apontados como agentes de dermatofitose e tem despertado grande interesse na Medicina Veterinária, são os fungos sapróbios, comumente isolados de cães e gatos e que pertencem aos gêneros *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp (6, 18). As espécies de *Aspergillus* estão amplamente distribuídas entre os fungos filamentosos saprofiticos, e embora o gênero contenha mais de cem espécies, somente um número limitado tem sido implicado em infecções oportunisticas em animais e humanos (25).

Fungos sapróbios podem ser achados no solo, ar, plantas e outros materiais, os quais estão em contato constante com os animais (10, 15). Em seres humanos doenças crônicas, terapias anticancerígenas, tratamentos prolongados com

antibióticos, terapias com esteróides, alguns fungos comumente considerados sapróbios podem assumir propriedades patogênicas e invadir tecidos, por esta razão é muito importante distinguir os fungos patogênicos dos sapróbios (22). Resultados de pesquisas sugerem como possíveis agentes etiológicos de dermatomicoses em gatos e cães os fungos sapróbios dos gêneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium* e *Curvularia* (22).

O tratamento das dermatofitoses deve ser direcionado para a erradicação do material infeccioso dos animais afetados, dos portadores e do ambiente. Para tal finalidade, ficam indicados os cortes dos pêlos, o isolamento apropriado, as medidas sanitárias, a terapia tópica e a administração sistêmica de medicamentos fungicidas ou fungistáticos (25).

Atualmente, em todos os lugares do mundo, a intervenção para o controle de doenças animais é largamente realizada por meio do uso de fármacos. A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, porem como as infecções por fungos representam o parasitismo de um organismos eucariótico sobre outro eucariótico (animal e homem), com diferenças fisiológicas muito pequenas é necessário que as drogas antifúngicos tenham aplicação clínica adequada com o mínimo de efeitos colaterais (30). As substancias antifúngicas mais utilizadas são os imidazóis, triazóis, flucitosina, alilaminas, antibióticos poliênicos e griseofulvina (19, 21, 24). Sem dúvida, o uso racional desses produtos pode ter um efeito positivo, no entanto em longo prazo, além do surgimento de microrganismos resistentes às substâncias químicas utilizadas, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem tornar-se negativos devido

à poluição causada pelos resíduos ^(19, 21). Na atualidade, muitas instituições têm se empenhado na utilização de tratamentos alternativos para o controle de diferentes agentes etiológicos de doenças. O tratamento à base de plantas medicinais, ou fitoterapia, está ganhando força inédita mundial. ⁽²⁾.

Devido a este motivo, o presente trabalho teve como objetivo determinar a ação antifúngica de extratos de plantas medicinais e óleo de eucalipto frente ao fungo sapróbio *Aspergillus niger*, com o intuito de verificar a potencialidade de utilização como um método alternativo de tratamento.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Camilo Castelo Branco, Campus de Fernandópolis, São Paulo.

Foi utilizado para avaliação da atividade antifúngica dos extratos de plantas e óleo de eucalipto o fungo sapróbio *Aspergillus niger* isolado de pêlo de cães. Este fungo foi escolhido, pois é o sapróbio mais frequente encontrado na microbiota normal dos pêlos dos cães e no ambiente, e em caso de baixa imunidade, este fungo pode causar graves casos de dermatofitose pelo fato de ser oportunista.

Na preparação do extrato bruto foram utilizadas folhas de arruda (*Ruta graveolens*), citronela (*Cymbopogon nardus*), tiririca (*Cyperus rotundus*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), graviola (*Annona moricata*), fruta do conde (*Annona* spp), manga (*Mangifera indica*), romã (*Punica granatum*), folhas e flores de calêndula (*Calendula* spp), e flores e folhas de primavera (*Bougainvillea glabra*) obtidas da coleção de plantas da Faculdade de Ciências Agrárias, UNICASTELO, Campus Fernandópolis.

Os extratos brutos foram preparados utilizando-se 300grs de folhas, previamente lavadas, e 450mL de água deionizada. O material vegetal foi misturado e triturado em liquidificador, esta mistura foi posteriormente coada e filtrada, e em seguida, os extratos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a uma atmosfera de pressão. Os extratos brutos foram conservados a 10 °C ± 2°C.

Para a determinação da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto foi utilizado

meio Sabouraud dextrose (Difco), preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi retirado da autoclave e resfriado até atingir 50°C, momento no qual foram adicionados e misturados perfeitamente os extratos brutos de plantas e óleo de eucalipto. Para cada concentração e cada tipo de extrato foram preparados 100mL de meio de cultura Sabouraud. As concentrações avaliadas foram de 0,5 a 10% (v/v). Foram empregadas placas de Petri (10 x 90mm) nas quais foram depositados 15mL de meio de cultivo, o mesmo permaneceu na câmara de fluxo laminar até total solidificação.

Uma vez solidificado, o meio foi inoculado com discos de micélio (1,5 mm) retirados de uma cultura de *A. niger*. Placas de Petri contendo meio Sabouraud sem adição do extrato, foram utilizadas como controle. Para cada tratamento foram utilizadas quatro repetições. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. a temperatura de 36 ± 0,5°C sem luminosidade, até o desenvolvimento do fungo, usando como parâmetro de crescimento a placa controle sem adição do extrato. O desenvolvimento do fungo foi analisado diariamente.

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada pela medição do diâmetro das colônias. Uma vez determinados os extratos com poder antifúngico foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos extratos e do óleo de eucalipto.

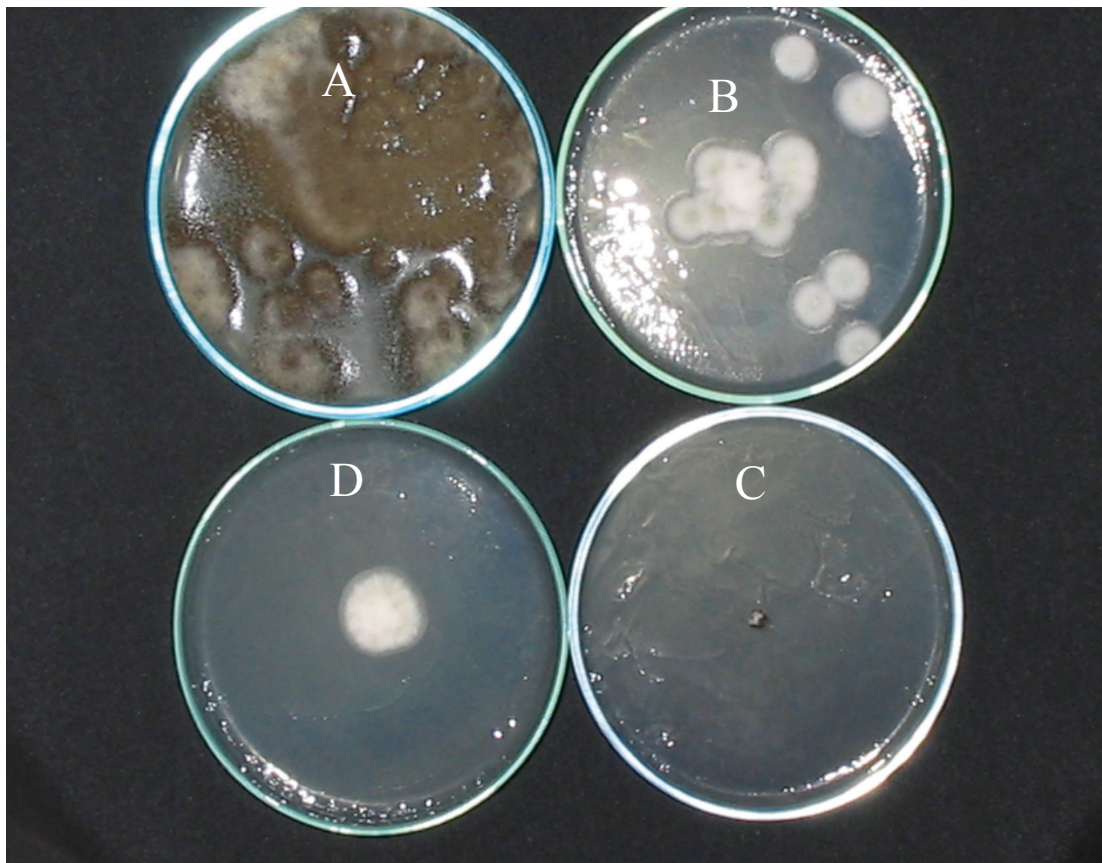
Resultados

A atividade fungicida de diferentes extratos brutos e óleo de eucalipto foram avaliadas, *in vitro*, contra o fungo sapróbio *Aspergillus niger*.

Os resultados obtidos do cultivo de *A. niger*, em meio de cultivo Sabouraud suplementado com doses crescentes de extratos brutos de plantas, foram diferentes para cada extrato.

As avaliações *in vitro* realizadas para avaliar o efeito de extratos de plantas sobre o desenvolvimento de *Aspergillus niger* mostraram que nenhum dos extratos apresentou atividade fungicida. Os extratos de folhas e flores de primavera, de folhas de calêndula, tiririca e eucalipto induziram o desenvolvimento do fungo com adição de apenas 1 mL de extrato em 15 mL do meio de cultura. Por outro lado, o óleo de eucalipto inibiu o crescimento de *Aspergillus niger* com uma MIC de 340 µl (Figura 1).

Figura 1. Atividade antifúngica do óleo de eucalipto sobre *Aspergillus niger*. (A) Meio de cultivo sem extrato (controle); (B, C, D) meio de cultivo com adição 330, 335, 340 μ L de extrato, respectivamente.



Discussão

Na maioria dos lugares do mundo o controle de doenças é realizado através de fármacos antimicrobianos^(19, 21, 24). A utilização racional desses produtos pode ter, efeitos positivos, no entanto, em longo prazo, podem ser negativos como resultado do surgimento de isolados resistentes às substâncias utilizadas^(19, 21). Todavia, somente os fármacos não serão capazes de resolver a crescente problemática das infecções fúngicas. Melhorias no diagnóstico de tais infecções, que propiciem maior rapidez no início da terapia e a escolha apropriada do antifúngico; além de profilaxia eficaz e desenvolvimento de medicamentos que aumentem a capacidade de resposta dos organismos também são necessários⁽²⁾.

A dermatofitose é a infecção fúngica superficial mais comum na medicina veterinária de pequenos animais⁽⁵⁾. As drogas utilizadas no tratamento desta infecção geralmente provocam efeitos colaterais, alguns com

eficácia limitada^(4, 13, 19, 21). Em função desses efeitos, a tendência atual é a utilização de fitoterápicos no controle e tratamento de microrganismos patogênicos^(6, 7, 12, 16). Nas últimas décadas observou-se um grande interesse pelo potencial terapêutico de plantas medicinais^(9, 16, 17, 23, 26, 28, 35). Além disso, sabe-se que cerca de 30% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas⁽¹⁶⁾.

A fitoterapia é uma forma de controle de agentes etiológicos através da utilização dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Esta tecnologia está sendo utilizada com êxito no controle de insetos, pragas e algumas doenças^(12, 32) razão que levou o desenvolvimento deste trabalho.

Alguns metabólitos isolados ou frações de extratos de plantas têm demonstrado atividade antifúngica, como por exemplo, o óleo essencial de *Lantana aculeata*

com atividade contra *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Penicillium* e *Rhizophus stolonifer* e o extrato etanólico de folhas de *Hyptis ovalifolia* contra alguns dermatófitos^(29, 32). A atividade antifúngica dos óleos essenciais extraídos de limão e citronela, e de alguns componentes dos óleos essenciais citral, geraniol, citronelol e citronelal foram testados em quatro fungos patogênicos (*Cândida albicans*, *Microsporium gypseum*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus niger*), sendo que o óleo de limão apresentou alta atividade antifúngica para todos os organismos testados e o óleo de citronela foi eficiente para *Microsporium gypseum*⁽⁷⁾. A eficiência de extratos etanólicos de *Cassia alata* e *Senna alata* foi verificada no controle de diversas espécies de fungos como: *M.canis*, *T. mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Candidas albicans* e *Monosporascus cannonballus*^(17, 34). No presente trabalho verificou-se a eficiência do óleo de eucalipto no controle de *Aspergillus niger*.

Em uma pesquisa realizada utilizando 60 amostras de dermatófitos ficou demonstrado que a fração aquosa do extrato de *Hyptis ovalifolia* inibiu o crescimento de 40% das amostras e o óleo essencial desta mesma planta inibiu o crescimento de 100% das amostras testadas⁽³²⁾. Outros autores também perceberam que extratos brutos de algumas plantas possuíam ação inibitória contra *Cryptococcus neoformans*⁽²³⁾. Outros já descreveram que o óleo essencial de *Eugenia dysenterica* tem uma boa ação contra *Cryptococcus neoformans* e que o óleo de *H. suaveolens* possui atividade contra *Candida albicans*^(1, 6).

Vários fatores podem influenciar a atividade antifúngica de extratos de plantas, como por exemplo, o ambiente ao qual a planta foi submetida, a fatores genéticos, a utilização de diferentes métodos de extração, ao pH, a temperatura e ao uso de diferentes concentrações⁽³⁴⁾. Como as amostras do material vegetal para produção dos extratos brutos, utilizado nesta pesquisa, foi colhido na mesma época e o método de extração foi o mesmo para todas as plantas pode-se afirmar que estes fatores não interferiram nos resultados obtidos. Vários trabalhos mostram que o uso de diferentes concentrações pode interferir nos resultados obtidos em experimentos onde foram utilizadas as mesmas espécies vegetais^(26, 31). Acredita-se que esta foi a razão pela qual nenhum dos extratos vegetais utilizados neste trabalho demonstrou eficiência contra o fungo testado.

Já a composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes. A época e local de colheita, horário, o modo de secagem e preparo, a umidade e o solo onde são cultivadas as plantas podem influenciar no teor do óleo extraído^(11, 28). Os óleos essenciais de eucalipto são compostos formados por uma complexa mistura de componente voláteis, apresentando grupos químicos como: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres⁽²⁷⁾. Como as substancias encontradas nos óleos de eucalipto apresentam grupo alcoólico, carbonilas e duplas ligações, é provável acontecem processos oxidação ou os compostos são metabolizados para outras substâncias provocando a inibição de crescimento e alteração da cor dos micélios fúngicos⁽²⁷⁾.

A atividade antifúngica do óleo de eucalipto no combate ao *A. niger* mostra a possibilidade de ser utilizado, após testes *in vivo*, como método alternativo de tratamento dermatofitose em cães causada por este fungo, porem devem ser realizadas pesquisas com a finalidade de avaliar doses e eficiência e por fim realizar as recomendações pertinentes para as diferentes espécies animais.

Conclusão

Conclui-se que, o óleo de eucalipto apresentou atividade antifúngica para *Aspergillus niger*, demonstrando que é possível utilizá-lo como método alternativo para tratamentos de doenças causadas por este fungo, porém, testes *in vivo* devem ser realizados para adequação do método de aplicação (loção, sabonete, pomada, gel tópico).

Os extratos vegetais testados não foram eficientes contra o *Aspergillus niger* tornando inutilizável o uso destes fitoterápicos contra este tipo de fungo. Em contrapartida, os extratos de folhas e flores de primavera e de folhas de calêndula induziram o desenvolvimento do fungo razão pela qual não é recomendável a sua utilização no tratamento de *A. niger*. Os resultados obtidos neste experimento deixam claro que a utilização de fitoterápicos deve ser feita sob a supervisão de profissionais, evitando assim um possível agravamento da doença.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asekun OT, Ekundayo O, Adeniyi BA. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. *Fitoterapia*; 70(4):440-442.
2. Bergold AM, Georgiadis S. 2004. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*; 5(2):159-172.
3. Cabañes, FJ. 2000. Dermatophytes in domestic animals. *Revista Iberoamericana de Micología*; 17: 104-108.
4. Carazo JLS, Losada LO, Sanjuan VP. 1999. Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Revista Iberoamericana de Micología*; 16: 26-30.
5. Copetti VM, Santuario JM, Cavlleiro AS, Boeck AA, Argenta JS, Aguiar LC, Alves SH. 2006. dermatophytoses isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil. *Acta scientiae veterinariae*; 34:119-124.
6. Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião LM, et al. 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*; 72:111-117.
7. Dharmendra S, Khanuja SPS, Kahol AP, Gupta SC, Sushil K. 2001. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. *Current-Science*; 80(10):1264-1266.
8. Frias DFR, Kozusny-Andreani DI. 2008. Isolamento e identificação de fungos associados à dermatofitose e dermatomicose em cães. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*; 3(2): 58-63.
9. Frias DFR, Kozusny-Andreani DI. 2009. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*; 11:216-220.
10. Gambale W, Correa B, Paula CR, Purchio A, Larsson CE. 1987. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP*; 24:187-191.
11. Gobbo Neto L, Lopes NP. 2007. Fatores que interferem no teor de metabólitos secundários. *Química Nova*; 30(2): 374-381.
12. Govindachari TR, Suresh G, Gopalakrishnan G, Maslamani S, Banumathi B. 2000. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*; 71(3):317-320
13. Gupta AK, Lynde CW, Lauzon GJ, Mehlmauer MA, Braddock SW, et al. 1998. Cutaneous adverse effects associated with terbinafine therapy: 10 case reports and a review of the literature. *Brazilian Journal Dermatology*; 138: 529-532.
14. Hirsh DC, Zee EEYC. 2003. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 446p.
15. Ishikawa MM, Lucas R, Larsson CE. 1996. Isolamento e identificação da microbiota fúngica e de dermatofitos da pele de equinos hígidos e de aqueles afetados por dermatofitose. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*; 33:170-175
16. Koehn FE, Carter GT. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug*

Discovery; 4(3): 206-220.

17. Makinde AA et al. 2007. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. African Journal of Biotechnology; 6(13): 1509-1510
18. Mancianti F, Papini R. Isolation of keratinophilic fungi from the floors of private veterinary clinics in Italy. 1996. Veterinary Research Communications; 20:161-166.
19. Martinez r. 2006. Atualização no uso de agentes antifúngicos. Revista Brasileira de Pneumologia; 32:449-460.
20. Mimani PS. 2003. Micologia: Métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses. São Paulo: Manole. 199p.
21. Nobre MO, Nascente OS, Meireles MC, Ferreiro L. 2002. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. Ciência Rural; 32:175-184.
22. Paixão GC, Sidrim JJC, Campos GMM, Brilhante RSN, Rocha MFG. 2001. Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia; 53:568-573.
23. Paula TF, Garcia ACF, Oliveira CMA, Martinez RC, Silva MRR. 2001. Propriedades antifúngicas de *Hyptis ovalifolia* sobre *Cryptococcus neoformans*. IN: Encontro Científico dos Acadêmicos de Medicina , 13., Rio Quente, 2001. Anais. Rio Quente: ECAM, p. 21.
24. Pigatto MC, Uchoa FT, Costa TD. 2009. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. Revista Brasileira de Farmacologia; 90:86-94.
25. Quin PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. 2005. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed. 611p.
26. Ranganathan S, Balajee SAM. 2000. Anti-*Cryptococcus* activity of combination *Cassia alata* e *Ocimum sanctum*. Mycoses; 43(7/8):299-301.
27. Salgado APS, Cardoso MG, Souza PE, Souza JÁ, Abreu CM, Pinto JEBP, 2003 Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *bipolaris sorokiniana*. Ciência Agrotécnica; 27:249-254.
28. Santos SC et al. 2004. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L fractions against *Paracoccidioides brasilienses* (Splendore) Almeida. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais; 7(1):30-33.
29. Saxena VK, Sharma RN. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana aculeata*. Fitoterapia; 70(1): 67-70.
30. Silva P. 2000. Farmacologia. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 870p.
31. Somchit MN et al. 2003. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. Journal of Ethnopharmacology; 84:1-4.
32. Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Junior JG, et al. 2002. Antifungal properties of Brazilian Cerrado plants. Brazilian Journal of Microbiology; 33: 247-249.
33. Tortora G J, Funke BR, Case CL. 2002. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed.

- 34.** Viana MG et al. 2008. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monoscaraspus cannonballus*. *Ciência Agrotécnica*; 32(5):1387-1393.
- 35.** Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinl Filho V. 2001. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*; 24(1):147-152.