

Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados

Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients

RIALA6/1198

Tatiane Morais FERREIRA¹, Fernando de Sá SILVA^{2*}, Guilherme Rodrigues TEODORO¹, Ana Carolina Borges Pereira da COSTA¹, Aguida MARIA³, Milton BELTRAME JÚNIOR⁴, Sônia KHOURI¹

*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 Microbiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

²Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

³Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Taubaté, Taubaté, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil.

Recebido: 01.10.2008 – Aceito para publicação: 12.02.2009

RESUMO

O citral, componente do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, tem sido pesquisado para verificar sua ação antimicrobiana em bactérias e fungos. Com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica do citral contra leveduras do gênero *Candida*, no presente trabalho foram avaliadas 32 amostras de *Candida albicans*, 25 de *C. tropicalis*, 20 de *C. parapsilosis* e 5 de *C. glabrata*, coletadas de pacientes hospitalizados. O citral foi testado nas concentrações de 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v), utilizando a técnica de difusão em ágar Sabouraud. A atividade antifúngica do citral foi constatada em todas as leveduras selecionadas nas concentrações $\geq 25\%$. Mediante os resultados obtidos, sugere-se a realização de novas pesquisas sobre citral frente às demais espécies de fungos patogênicos para conhecer as características toxicológicas e farmacológicas para que esse componente possa futuramente ser utilizado como um importante princípio ativo na produção de novos agentes antifúngicos.

Palavras-chave. citral, *Candida* sp, leveduras, fungos e infecção hospitalar.

ABSTRACT

Citral is the *Cymbopogon citratus* essential oil compound which has been investigated to verify its antimicrobial activity on bacteria and fungi. Aiming at evaluating the antifungal activity of citral on *Candida* sp yeasts, the present investigation analyzed 32 samples of *Candida albicans*, 25 of *C. tropicalis*, 20 of *C. parapsilosis* and 5 of *C. glabrata* isolated from hospitalized patients. Citral at concentrations of 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, and 60% (v/v) were assayed by agar diffusion technique on Sabouraud medium. The antifungal activity of citral was evidenced on all selected yeast at concentration of $\geq 25\%$. Hence, further studies on citral antimicrobial activity on other pathogenic fungi species could be performed, also on the citral toxicological and pharmacological properties in order to be used as an crucial active principle for manufacturing new antifungal agents.

Key words. citral, *Candida* sp, yeasts, fungi and hospital infection.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

INTRODUÇÃO

A partir da década de 1970, observou-se um aumento na incidência das infecções sistêmicas graves por fungos oportunistas¹. Registros no Sentry Antimicrobial Surveillance Program referentes a agentes isolados nos casos de infecção sanguínea nosocomial apresentam leveduras do gênero *Candida* ocupando a quarta posição².

Candida albicans (*C. albicans*) é a espécie mais frequentemente isolada e a principal envolvida na etiologia das infecções invasivas e superficiais^{2,3,4}. Entretanto, tem sido verificada uma crescente participação de espécies não-*albicans* nas infecções hospitalares em vários países^{2,5,6,7,8,9,10}. No Brasil, um estudo realizado na Santa Casa Complexo Hospitalar, foi verificado que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 51,6% dos episódios de candidemia da Instituição; *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, e outras espécies foram responsáveis por 25,8%, 13,3%, 3,3%, 1,7% e 7,5% dos casos, respectivamente¹¹.

Estudos relacionados às infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* têm mostrado que aproximadamente metade dos indivíduos, internados em unidades hospitalares, acometidos por candidemia evoluem para óbito. Entre as espécies responsáveis pelo elevado índice de mortalidade destacam-se *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*^{3,12}. Não obstante, espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos disponíveis, atualmente, têm sido encontradas em várias regiões do mundo^{2,4,10,13,14,15}.

Desse modo, em consideração ao aumento das infecções hospitalares causadas por leveduras do gênero *Candida*, bem como a ocorrência de cepas resistentes aos atuais antifúngicos, muitos trabalhos vêm sendo realizados com produtos de diversas espécies vegetais, frente a vários micro-organismos como, fungos e bactérias^{16,17,18}. Entre as plantas utilizadas destaca-se *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como capim-limão, da qual o óleo essencial extraído tem sido ativo contra leveduras do gênero *Candida*¹⁶. Tal atividade, segundo Onawunmi¹⁹, deve-se ao citral (3,7-dimetil-2,6 octadienal), componente majoritário do óleo obtido de folhas frescas, constituído de, aproximadamente, 40% de geranial e 31% de neral^{20,21}.

Dentre as propriedades biológicas do citral, destaca-se sua ação fungicida^{22,23}. Souza et al.²⁴ determinaram o perfil de sensibilidade de fungos filamentosos, isolados de alimentos, a vários fitoconstituíntes obtidos de distintos óleos essenciais. Dentre os fitoconstituíntes utilizados, o

citral apresentou a melhor atividade antifúngica para a maioria das cepas avaliadas.

No entanto, a atividade fungicida do citral tem sido verificada principalmente em fungos filamentosos, sendo poucos os estudos realizados com leveduras. Desse modo, devido a escassez de estudos realizados com fungos leveduriformes, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do citral, contra leveduras do gênero *Candida* obtidas de pacientes hospitalizados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba.

O componente citral (sintético), denominado 3,7 dimetil – 2,6 – octadienal (mistura *cis* e *trans* à 95%), utilizado nos testes antifúngicos, foi obtido pela empresa ACROS®.

Para os testes microbiológicos foram estudadas amostras de leveduras do gênero *Candida* registradas e pertencentes à Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz e Hospital Universitário de Taubaté (HUT). Tais amostras foram isoladas de diversas localidades (cateter, sondas, secreções das vias aéreas e gástricas, pele e mucosas, líquido peritoneal e sangue) de pacientes com suspeita clínica de infecção hospitalar.

Foram estudadas 32 cepas de *C. albicans*, 25 de *C. tropicalis*, 20 de *C. parapsilosis* e 5 de *C. glabrata*, bem como cepas padrões de *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019).

O método utilizado nos ensaios microbiológicos foi difusão em ágar (Pourplate). Em placas de antibiograma estéreis, foi acrescentado 1 mL da suspensão do micro-organismo, preparada em solução fisiológica e padronizada a 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a 10⁶ UFC/mL. Posteriormente, foram adicionados 70 mL de ágar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratórios Ltda). Após a solidificação do meio, foram realizadas seis cavidades radiais e uma central de 6 mm de diâmetro.

Para a avaliação antifúngica, o citral foi diluído em óleo vegetal de amêndoa (LECLERC-LTDA). As concentrações preparadas foram: 10%, 15%, 25%, 35%, 50% e 60% (v/v). O nitrato de miconazol (20 mg/mL) foi utilizado como controle positivo.

Nas cavidades radiais foram aplicadas 20 µL de cada uma das concentrações preparadas do citral, e na cavidade central o controle positivo nitrato de miconazol

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBP, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

(20 µL). As placas permaneceram à temperatura ambiente até a total pré-difusão. Em seguida, foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas medindo, em milímetros, o diâmetro dos halos de inibição formados. Consideraram sensíveis ao citral todas as cepas com formação de halos de inibição ausentes de colônias microssatélites no seu interior. O resultado final foi determinado pela média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição de cada concentração do citral e controle positivo, entre as cepas da mesma espécie, considerando a distribuição normal sendo o desvio padrão $\sigma_{(n-1)}$ ^{16,17}.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes para avaliar a atividade antifúngica do componente citral contra as leveduras do gênero *Candida* encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

De acordo com os testes, foi constatada atividade antifúngica do citral em 100% das leveduras selecionadas a partir das concentrações de 15% para *C. albicans* (Tabela 1) e *C. glabrata* (Tabela 4), com halos de inibição numa média de 12 e 9 mm de diâmetro, respectivamente; e 25% para *C. tropicalis* (Tabela 2) e *C. parapsilosis* (Tabela 3) com halos em média de 14 e 10 mm, respectivamente.

Na menor concentração avaliadas (10%), 76% das cepas de *C. albicans* e 20% das cepas de *C. tropicalis* foram sensíveis, formando halos de inibição entre 8 a 11 mm e 8 a 10 mm, (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Contudo, para *C. parapsilosis* e *C. glabrata* não ocorreu a formação de halos nesta concentração (Tabelas 3 e 4, respectivamente). Em relação à maior concentração de citral utilizada (60%), as médias dos halos de inibição das cepas de cada espécie estudada ficaram abaixo da média do controle positivo (Figura 1).

Das espécies estudadas, verificaram-se expressivas variações, de acordo com o desvio padrão, no grau de sensibilidade em algumas cepas, exceto para as amostras de *C. glabrata* o qual os halos foram parecidos (Tabela 4).

A Figura 1 representa as médias dos diâmetros dos halos de inibição de cada espécie de *Candida*, nas distintas concentrações do citral e nitrato de miconazol.

DISCUSSÃO

Cada vez mais, têm sido realizadas pesquisas relacionadas a micro-organismos considerados de alta patogenicidade a sobrevivência humana e resistência a antibióticos, associados

às infecções oportunistas, principalmente àqueles responsáveis por infecção hospitalar¹⁶. Assim, com o aumento considerável de infecções por leveduras do gênero *Candida*, em ambiente hospitalar e resistentes aos atuais antifúngicos^{3,10,12,13,14,15,25} pesquisadores têm se dedicado a estudos de novos fármacos, sejam de origem natural ou sintética, com intuito de obter novos princípios ativos para uma possível aplicação clínica. Neste trabalho, verificou-se promissora atividade antifúngica do citral contra as leveduras de *Candida* obtidas de pacientes hospitalizados.

Com base nos resultados pôde-se observar que, de um modo geral, *C. albicans* foi a espécie mais sensível em relação às não-*albicans* frente ao citral (Figura 1). *C. tropicalis* foi a segunda espécie mais sensível ao citral (Tabela 2). Esta espécie é considerada o segundo ou terceiro agente etiológico mais comum nas infecções hospitalares no Brasil^{26,27}, sendo responsável pelo alto índice de mortalidade em pacientes com candidemia^{3,12}. Vale ressaltar que algumas cepas de *C. tropicalis* têm sido citadas como resistentes ao fluconazol²⁸. *C. parapsilosis* foi a espécie de menor sensibilidade ao citral (Figura 1); nenhuma cepa desta espécie foi sensível nas concentrações abaixo de 25%, e o diâmetro dos halos foram relativamente menores que às demais espécies (Tabela 3).

C. albicans também mostrou maior sensibilidade ao nitrato de miconazol, do que as espécies não-*albicans*

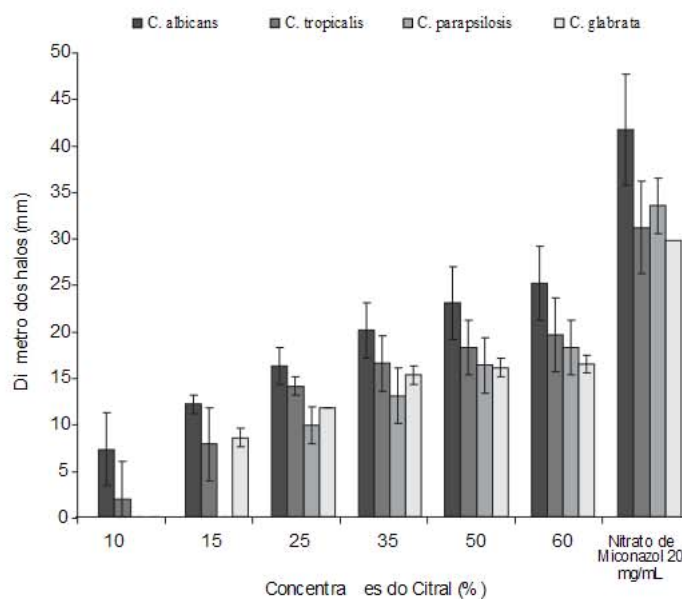


Figura 1. Média dos halos de inibição (em mm) das amostras hospitalares de leveduras do gênero *Candida* sp frente ao citral (20 µL) em diferentes concentrações e ao controle positivo nitrato de miconazol (20 µL) a 20 mg/mL.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

Tabela 1. Avaliação antifúngica do citral contra cepas de *C. albicans* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
003	11	14	18	24	33	34	52
008	0	10	14	15	17	18	28
011	11	14	20	27	30	30	49
012	10	12	17	23	30	32	48
013	9	11	17	25	27	29	47
014	9	13	20	23	27	27	47
015	10	14	18	25	26	26	47
020	11	13	16	18	20	22	40
023	9	14	20	23	24	26	52
024	9	14	18	24	27	34	43
030	0	11	14	17	19	21	31
031	9	11	16	19	22	24	47
034	0	11	13	15	19	19	44
035	8	10	15	16	17	20	40
055	9	11	16	17	19	21	51
056	11	13	20	22	24	26	47
060	11	12	17	21	30	34	37
061	9	11	16	20	24	26	40
064	0	10	15	18	24	26	40
065	9	11	14	19	24	29	34
069	0	12	15	19	21	22	36
070	0	12	16	22	22	23	35
072	10	13	16	18	21	25	35
073	10	12	15	19	20	22	40
074	0	12	16	22	23	23	40
078	9	13	17	20	20	21	40
085	9	11	16	18	20	22	50
086	0	15	17	24	26	28	40
087	8	10	16	20	23	26	43
091	10	14	15	18	20	24	40
094	10	12	15	19	24	28	43
104	10	13	16	20	22	25	37
ATCC 10231	11	14	16	19	21	25	45
Média em mm	7	12	16	20	23	25	42
Desvio padrão	± 4	± 1	± 2	± 3	± 4	± 4	± 6

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.
Resultados numéricos em mm.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

avaliadas (Figura 1). Sugerem-se estudos para verificar qual o mecanismo da ação antifúngica do citral sobre leveduras, uma vez que não existem trabalhos que relatem tal mecanismo. Porém, um estudo realizado com esporos de *Aspergillus flavus* demonstrou que o citral tem capacidade de: danificar diretamente a parede e a membrana celular dos esporos, causando a diminuição do volume celular;

aumentar a concentração e a agregação não funcional de macromoléculas levando à desordem metabólica; afetar o sistema de oxidação e o ciclo do ácido tricarboxílico sendo verificadas também mudanças na forma, no número e na diminuição da função das mitocôndrias; além de causar danos no DNA²³. Já o mecanismo de ação dos azóis, outro antifúngico, consiste em interferir na biossíntese

Tabela 2. Análise da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. tropicalis* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
005	0	12	15	17	18	19	34
006	10	12	16	26	30	30	34
009	10	11	15	19	25	27	43
033	0	8	13	17	19	20	35
037	8	13	16	17	18	20	33
041	0	0	15	16	16	16	29
045	0	10	15	16	17	17	25
047	0	9	15	18	19	20	30
048	0	0	14	16	17	18	25
050	0	10	15	17	18	19	29
051	0	9	13	15	16	16	24
054	0	0	13	15	16	16	24
057	0	9	14	15	17	20	35
058	10	11	14	18	22	25	35
062	0	0	17	20	23	25	38
066	0	10	15	16	17	18	30
067	0	10	15	17	20	21	30
071	0	9	15	16	17	20	31
081	9	9	13	16	18	21	40
082	0	8	12	14	15	16	29
083	0	10	13	15	16	17	28
095	0	8	15	18	19	20	35
097	0	10	14	15	16	19	32
101	0	9	13	16	17	19	36
103	0	0	10	12	14	15	22
Média em mm	2	8	14	17	18	20	31
Desvio padrão	± 4	± 4	± 1	± 3	± 3	± 4	± 5

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.
Resultados numéricos em mm.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

de ergosterol das células fúngicas, através da inibição da enzima 3A (CYP3A) do citocromo P-450, a lanosina 14-desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol. Em consequência, há alteração na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo. Os azóis atuam também sobre leveduras do gênero *Candida* impedindo a transformação das células leveduriformes em hifas, sua forma patogênica¹.

Dentro das espécies estudadas, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, não houve uniformidade na formação dos halos de inibição, o que reflete diferenças de sensibilidade de cada cepa ao citral. Tal comportamento

pode ser justificado pela origem clínica destas amostras, pois as cepas foram obtidas de pacientes com diferentes graus de enfermidade, sítios de coleta e tratamentos com antifúngicos (Tabelas 1, 2 e 3).

Mesmo quando os halos de inibição formados pelas amostras de *Candida* não-*albicans* (Tabelas 2, 3 e 4) foram relativamente menores que aqueles formados pelas amostras de *C. albicans* (Tabela 1), não foi observada resistência ao citral em nenhuma das cepas selecionadas. Cabe ressaltar que a concentração mínima do citral para sensibilizar todas as leveduras do gênero *Candida* foi 25% (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Tabela 3. Avaliação da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. parapsilosis* isoladas de diferentes espécimes clínicos de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
002	0	0	9	10	12	15	32
004	0	0	10	12	14	17	34
007	0	0	8	10	14	18	35
010	0	0	8	10	12	14	30
022	0	0	10	13	16	20	35
026	0	0	14	16	25	26	38
038	0	0	8	12	15	18	34
042	0	0	13	15	19	20	38
044	0	0	9	10	20	20	34
049	0	0	11	15	20	20	37
052	0	0	9	10	15	15	34
053	0	0	8	9	13	14	34
059	0	0	9	15	16	20	33
080	0	0	13	14	19	20	36
089	0	0	8	15	15	16	35
090	0	0	10	15	15	16	30
093	0	0	8	12	14	20	37
099	0	0	12	17	19	20	30
100	0	0	9	15	16	19	30
102	0	0	10	14	17	18	34
ATCC	0	0	12	17	20	20	30
Média em mm	0	0	10	13	16	18	34
Desvio padrão	± 0	± 0	± 2	± 3	± 3	± 3	± 3

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.
Resultados numéricos em mm.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

Tabela 4. Resultado da ação antifúngica do citral contra cepas de *C. glabrata* isoladas de diferentes espécimes clínicas de pacientes internados no HUT

Cepas	Concentrações em % (v/v) - 20 µL						Controle positivo 20 µL (Nitrato de Miconazol) 20 mg/mL
	10	15	25	35	50	60	
016	0	8	12	16	17	17	30
032	0	9	12	16	16	16	30
036	0	8	11	14	15	17	30
039	0	9	12	16	17	17	30
040	0	9	12	15	16	16	30
Média em mm	0	9	12	15	16	17	30
Desvio padrão	± 0	± 1	± 0	± 1	± 1	± 1	± 0

HUT: Hospital Universitário de Taubaté.
Resultados numéricos em mm.

O citral tem mostrado ter alta eficiência sobre cepas de *C. albicans*, inclusive superando antifúngicos como a nistatina e cloreto de benzalcônio^{17,19,29,30}. No entanto, no presente trabalho foi utilizado o nitrato de miconazol como controle positivo, numa concentração relativamente alta, que mostrou maior eficiência sobre as leveduras que o citral. Vale ressaltar que os trabalhos, citados acima, utilizaram poucas amostras sendo a maioria cepas padrões (ATCC). Nosso trabalho se difere pelo fato de se utilizar uma quantidade relativamente grande de isolados clínicos como amostras que, por sua vez, são conhecidas como resistentes aos antifúngicos convencionais^{2,4,10,13,14,15}.

Mesmo com a escassez de dados relacionados à ação antifúngica do citral contra *Candida* sp., é possível comparar a diferença no grau de sensibilidade entre as cepas de uma mesma espécie, com a atividade antifúngica do óleo essencial obtido das folhas de *Cymbopogon citratus* (capim limão), já que o citral corresponde cerca de 70% dos constituintes do óleo^{20,21}. Lima e Farias¹⁶, ao analisarem o referido óleo, verificaram variações no diâmetro dos halos de inibição em oito isolados clínicos de *C. albicans* (20 a 40 mm), em duas cepas de *C. tropicalis* (20 e 32 mm) e em duas cepas de *C. parapsilosis* (20 e 28 mm).

Segundo Onawunmi³¹, o citral possui uma melhor atividade em pH alcalino, e pode ser utilizado em combinação a outros agentes para aumentar sua atividade antimicrobiana. Em consequência da avaliação da atividade antifúngica do citral contra *Candida* sp., e da não ocorrência de cepas resistentes à este componente,

o presente trabalho abre perspectivas na produção de novos antifúngicos; já que estudos vem relatando o aumento de leveduras do gênero *Candida* resistentes aos antifúngicos convencionais disponíveis atualmente para uso clínico.

CONCLUSÃO

O citral mostrou boa atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida* de origem hospitalar. Todas as cepas avaliadas foram sensíveis a partir da concentração de 25%. Sendo assim, sugere-se futuros estudos do citral frente a outras espécies de fungos patogênicos, como também ensaios toxicológicos e farmacológicos para que este componente possa ser utilizado, futuramente, como um importante princípio ativo na produção de novos antifúngicos.

REFERÊNCIAS

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
2. 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.
3. 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.

Ferreira TM, Silva FS, Teodoro GR, Costa ACBB, Maria A, Beltrame Júnior M, Khouri S. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, 68(1):118-25, 2009.

4. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VL, Ruiz LRB, et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. An Bras Dermatol 2004; 79(6): 689-97.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Odds FC, Hanson ME, 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.
11. Antunes AGV, Pasqualotto AC, Diaz MC, D'Azevedo A, Severo LC. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. Rev Inst Med Trop São Paulo 2004; 46(5): 239-41.
12. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis 2003; 37: 634-43.
13. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NE, 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.
14. 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.
15. 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.
16. Lima EO, Farias NMP, et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. R Bras Ci Saúde 1999; 3(1/3): 51-64.
17. 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.
18. 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.
19. Onawunmi GO. Evaluation of the antifungal activity of lemon grass oil. Int J Crude Drug Res 1989; 27(2): 121-6.
20. Lewinsohn E, Dudai N, Tadmor Y, Katzir I, Ravid U, Putievsky E, et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae. Ann Bot (Lond) 1998; 81: 35-9.
21. Saleem M, Afza N, Anwar MA, Hai SM, Ali MS. A comparative study of essential oils of *Cymbopogon citratus* and some members of the genus *Citrus*. Nat Prod Res 2003; 17(5): 369-73.
22. Hayes AJ, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. Food Chem Toxicol 2002; 40(4): 535-43.
23. Luo M, Jiang LK, Huang YX, Xiao M, Li B, Zou GL. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. Acta Biochim Biophys Sin 2004; 36(4): 277-83.
24. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz Arch Biol Technol 2005; 48(2): 245-50.
25. Miranda ET, Silva RAM, Fusco-almeida AM, Melhem MSC, Pukinskas SR, Mendes-Giannini MJS. Epidemiologia de candidíase hospitalar: a importância da identificação específica. Rev Ciênc Farm 2003; 24(1): 39-45.
26. Oliveira RDR, Maffei CML, Martinez R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. Rev Assoc Med Bras 2001; 47 (3): 231-5.
27. Godoy P, Tiraboschi NI, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(3): 401-5.
28. Silva VV, Diaz MCJ, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. Rev Chil Infect 2002; 19 (Supl 2): 149-56.
29. Silva CB, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2008; 12(1): 63-6.
30. Abe S, Sato Y, Inoue S, Ishibashi H, Maruyama N, Takizawa T, et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. Jpn J Med Mycol 2003; 44(4): 285-91.
31. Onawunmi GO. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Letters in applied microbiology 1989; 9: 105-8.