



PIBIC/CNPq/UFPG-2012

ESTUDO COMPARATIVO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA EM DIFERENTES TEMPOS DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Morgana Pordeus do Nascimento Forte¹, Cristina Ruan Ferreira de Araújo²

RESUMO

A quitosana é um polímero derivado da quitina, de baixo custo, renovável e biodegradável, sendo de grande importância econômica e ambiental. Espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota humana normal. Todavia, quando há uma ruptura na homeostase do hospedeiro, as espécies do gênero *Candida* tendem a se tornar patogênicas. Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta para usos diversos, dentre eles, como antimicrobiano. Esse trabalho objetivou avaliar a ação antifúngica da quitosana de baixo peso molar em diferentes tempos de crescimento das seguintes leveduras do gênero *Candida* (ATCC): *Candida* sp, *C. albicans* sorotipo A e sorotipo B, obtidas na Fundação Oswaldo Cruz, através da Concentração Inibitória Mínima pela técnica de microdiluição. O composto foi testado frente às concentrações puras (20mg/mL) e nas diluições referentes às concentrações de 10 mg/mL, 05 mg/mL, 1,75 mg/mL, 0,875 mg/mL, 0,437 mg/mL, onde foi observado que as cepas de *Candida albicans* e *Candida albicans* sorotipo A testadas foram sensíveis à quitosana, demonstrando assim o caráter antifúngico do composto estudado.

Palavras-chave: quitosana, antimicrobiano, levedura.

COMPARATIVE STUDY OF THE CHITOSAN ANTIFUNGAL'S ACTION AT DIFFERENT TIMES OF GROWTH OF YEAST OF GENDER *Candida*

ABSTRACT

Chitosan is a polymer derived from chitin, low cost, renewable and biodegradable, being of great economic and environmental importance. *Candida* species reside as commensals, being part of the normal human microbiota. However, when there is a disruption in the homeostasis of the host, *Candida* species tend to become pathogenic. Because it is a natural polymer, biodegradable, nontoxic, and numerous, chitosan has been proposed for many uses, including as antimicrobial. This study aimed to evaluate the antifungal effect of low molecular weight chitosan at different growth times of those *Candida* yeasts (ATCC): *Candida* sp, *C. albicans* serotype A and serotype B, obtained from the Oswaldo Cruz Foundation, through the Minimum Inhibitory Concentration by microdilution technique. The compound concentrations were tested against pure (20mg/mL), and the dilutions on the concentration of 10 mg/mL, 05 mg/ml, 1.75 mg/mL 0.875 mg/mL 0.437 mg/mL, it was observed that where strains of *Candida albicans* and *Candida albicans* serotype A tested were sensitive to chitosan, thus demonstrating the character of the antifungal compound studied.

Keywords: chitosan, antimicrobial, yeast.

¹Aluna do Curso de Medicina, Unidade Acadêmica de Ciências e Saúde, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: morganapordeus@yahoo.com

²Medicina, Professora. Doutora, Unidade Acadêmica de Ciências e Saúde, UFPG, Campina Grande, PB, E-mail: crisruan@yahoo.com.br *Autor para correspondências

INTRODUÇÃO

A quitosana é um polímero formado por uma cadeia longa de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, sendo um derivado da quitina, um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza, cuja fórmula estrutural da quitina é semelhante à da celulose com a qual compartilha a função estrutural em matérias vivas (SILVA, 2005; OLIVEIRA, 2004).

Diversos estudos relatam a quitosana com caráter antifúngico, sendo descrita principalmente sua ação fungistática. O mecanismo de ação envolve a morfogênese da parede celular, onde as moléculas de quitosana vão interferir diretamente no crescimento do fungo, similarmente aos efeitos da quitosona observados nas bactérias (EL GHAOUTH, 1992 apud Goy ET AL, 2009).

Espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal na boca, no trato gastrointestinal, trato genitourinário e na região retal em indivíduos saudáveis. Todavia, quando há uma ruptura da homeostase na microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (BARBEDO et al. 2009).

Apesar do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis nos últimos anos, estes ainda encontram-se em desvantagem, quando comparados às drogas antibacterianas. Além disso, a resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica (BATISTA; BIRMAN; CURY, 1999; CHAMI et al., 2005).

Diante do fato de vários pesquisadores terem intensificado seus estudos no campo da medicina alternativa, investigando substâncias naturais que podem ser utilizadas como antimicrobianos. Torna-se útil, além do conhecimento acerca da capacidade antifúngica da quitosana, saber em qual nível de crescimento tal biopolímero age. Portanto, tal trabalho objetivou estudar mais profundamente como se dá a ação antifúngica da quitosana em diferentes tempos de crescimento de tipos de cêndidas relacionados com infecções que atingem as diversas partes no organismo humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo do tipo experimental.

2 Obtenção da quitosana

A quitosana purificada de baixo peso molar foi comprada com recursos próprios em uma empresa de confiança, a Sigma-Adrick, já testada por outros pesquisadores em experimentos (TAPIA et al., 2009).

3 Preparo do gel de quitosana

A quitosana foi diluída em ácido acético 1% para obtenção de quitosana com concentração inicial 40mg/mL (2g de quitosana diluída em 50mL de AC 1%). A solução ficou em agitação por 12h e depois em repouso por mais 12h. Após esse período foi feito o ajuste do pH com Hidróxido de Sódio a 4% para obtenção de pH 6,0. Tal ajuste de pH foi realizado sob agitação para melhor homogeneização da base.

4 Preparo da solução de fluconazol

O fluconazol foi diluído em metanol para obtenção de uma solução inicial de 40 mg/ml (2g de fluconazol diluído em 50mL de metanol).

5 Determinação da atividade antifúngica da quitosana em diferentes tempos de crescimento

- Inóculo Microbiano

As cepas fúngicas foram repicadas em Agar Sabouraud e incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C, 24h antes da realização do experimento, para fazer o pré-inóculo, obtendo suspensões padronizadas em 10^7 células viáveis/mL em caldo Sabouraud. Em seguida, foi feito o inóculo em Caldo Sabouraud, que serve para análise de cada cepa em tempos de crescimento diferentes, comparando com as concentrações referidas em curva de crescimento padrão de cada espécie.

- Curva de crescimento

De acordo com Gava (1984), realizando contagens microbianas periódicas e, ao se fazer um gráfico, colocar o logaritmo do número de microorganismos viáveis por mililitro na ordenada e a unidade de tempo na abscissa, obteremos uma curva de crescimento. Diante disso, foi feita a preparação do inóculo puro das cepas para posterior início de coleta de duas em duas horas com plaqueamento e quantificação celular estimada através da avaliação da densidade óptica (D.O.) em comprimento de onda de 620, seguida de contagem após 24 e 48 horas de tais preparações. A partir das quatro horas de crescimento foram realizadas diluições seriadas com plaqueamento e D.O. de cada uma delas no intuito de facilitar a contagem de células. A última coleta foi realizada cento e quarenta e quatro horas após o início. De tal forma, obtivemos uma curva de crescimento padrão das espécies em análise sem ação da quitosana para posterior comparação de uma curva de crescimento com tal composto em ação.

- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para cada tempo de ação da quitosana em relação ao crescimento fúngico – Técnica de Microdiluição.

A técnica da microdiluição é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada desta maneira porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou chato, próprias para microdiluição (ALVES *et al.*, 2008).

Foram utilizadas microplacas contendo 96 orifícios com fundo em forma de “U”, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de “A” a “H”.

As colunas 1 e 2 foram utilizadas para quitosana de baixo peso molecular. A coluna 4 foi utilizada como controle negativo, tendo somente meio de cultura Caldo Sabouraud. A coluna 5 continha o controle positivo, onde há meio de cultura e inoculo. No que se refere à coluna 6, conteve apenas metanol e meio de cultura. Enquanto as colunas 11 e 12 foram utilizadas para testar fluconazol e metanol em diferentes concentrações.

Inicialmente, nas colunas 1 e 2 foram adicionados 45 µL da solução de quitosana possuindo diferentes concentrações (0 a 20mg/mL) e 45 µL de caldo Sabouraud e posteriormente inoculado 10 µL de cada suspensão de diferentes. Na coluna 4, foi colocado 45 µL de Caldo Sabouraud. Na coluna 5, 90 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inoculo. Na coluna 6, 45 µL de metanol, 45 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inoculo. Quanto às colunas 10 e 11, foram preenchidas com 45 µL da solução de fluconazol, 45 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inoculo. Ao final, cada orifício onde foi testado uma solução antimicrobiana possuía 100 µL.

Após 24 horas do período de incubação das microplacas, foi adicionado 30 µL de resazurina em cada orifício das colunas 1, 4, 5, 6 e 11. As colunas 2 e 12 foram utilizadas para determinação da CFM.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO *et al.*, 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento fúngico enquanto que as variações de rosa e roxo são indicativos da presença de células viáveis para crescimento. Após 15 e 30 minutos foram feitas as análises da mudança de cor.

Diante da mudança de cor para determinação da CIM, a primeira concentração que houve crescimento visível e duas imediatamente acima foram testadas para encontrar a CFM. Dessa forma, foram colocados 10 µL das cavidades da microplaca (sem resazurina) em placa de Petri, as quais foram posteriormente incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. A placa onde estava incubada a menor concentração de quitosana e não houve crescimento algum foi considerada CFM.

RESULTADO E DISCUSSÃO

- **Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) de quitosana e fluconazol para cada tempo de crescimento da espécie *Candida albicans* sp**

Nesta primeira análise, observamos que a quitosana se mostrou mais eficaz para inibir o crescimento da *Candida albicans*. Até a quarta hora de crescimento, tanto a quitosana quanto o fluconazol possuíram a mesma CIM de 0,875. A partir da sexta hora de crescimento, a quitosana já se mostrou mais eficaz, pois sua CIM foi de 0,875 até a 24^a hora de crescimento, enquanto o fluconazol teve aumento gradativo de sua concentração necessária para inibir o crescimento do fungo em estudo, como visto nas seguintes tabelas.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima da quitosana e do fluconazol na espécie *Candida albicans* sp inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CIM (mg/mL) da quitosana	CIM (mg/mL) do fluconazol
00	0,875	0,875
02	0,875	0,875
04	0,875	0,875
06	0,875	1,75
08	0,875	1,75
10	0,875	1,75
12	0,875	2,5
15	0,875	05
18	0,875	05

24	0,875	10
36	2,5	10
48	2,5	05
72	05	2,5
96	05	05
120	05	05
144	05	05

- **Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de quitosana para cada tempo de crescimento da espécie *Candida albicans* sp**

No que se refere à CFM de cada tempo analisado em curva de crescimento, vimos que até o tempo 18 de crescimento, a concentração inibitória mínima da quitosana foi a menor concentração testada nos experimentos, enquanto a partir de 24 horas de crescimento, a concentração necessária para inibir o crescimento de tal espécie de cândida foi aumentando de forma gradativa, como exposto na tabela 3.

Tabela 3. Concentração Fungicida Mínima de quitosana na espécie *Candida albicans* inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CFM (mg/mL)
24	1,75
36	2,5
48	2,5
72	10
96	10
120	10
144	20

- **Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) de quitosana e fluconazol para cada tempo de crescimento da espécie *Candida albicans* sorotipo A**

No caso de *Candida albicans* sorotipo A, a quitosana apresentou-se eficaz em sua menor concentração (0,875) até a hora 15 de crescimento, enquanto o fluconazol esteve em sua menor concentração de forma eficaz apenas até quatro horas de crescimento, conforme visto nas tabelas a seguir.

Tabela 4. CIM da quitosana e do fluconazol na espécie *Candida albicans* sorotipo A inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CIM (mg/mL) da quitosana	CIM (mg/mL) do fluconazol
00	0,875	0,875
02	0,875	0,875
04	0,875	0,875
06	0,875	1,75
08	0,875	1,75
10	0,875	1,75
12	0,875	1,75
15	0,875	1,75
18	1,75	1,75
24	1,75	2,5
36	2,5	2,5
48	2,5	05
72	1,75	2,5
96	1,75	05
120	0,875	05
144	0,875	2,5

- **Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de quitosana para cada tempo de crescimento da espécie *Candida albicans* sorotipo A**

No que se refere a CFM, da 15^o hora até a 24^o, a CFM foi igual à CIM. A partir da 36^a hora de crescimento, onde a CIM para esta hora foi de 2,5 mg/mL, a CFM correspondeu à 5 mg/mL, assim como para as horas 38, 72 e 96 de crescimento. Em relação aos tempos 120 e 144, a CIM dos mesmos foi de 0,875 mg/mL, porém suas CFM foi de 5mg/mL.

Tabela 4. CFM da quitosana na espécie *Candida albicans* sorotipo A inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CFM (mg/mL)
15	0,875
18	0,875
24	1,75
36	5
48	5
72	5
96	5
120	5
144	5

- **Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) e CFM de quitosana e fluconazol para cada tempo de crescimento da espécie *Candida albicans* sorotipo B.**

No caso da *Candida albicans* sorotipo B, não foram obtidos resultados, visto que a resazurina não reagiu nem mesmo com o controle positivo em alguma fase de crescimento, por mais que na curva de crescimento realizada houvesse crescimento contabilizado acima de 10⁶ UFC.

• DISCUSSÃO

Como visto nos resultados, a quitosana se apresentou mais eficaz que o fluconazol nas duas cândidas que obtiveram resultados com a resazurina. De maneira geral, a quitosana se fez necessária em menores concentrações para ser capaz de inibir e/ou matar o crescimento da *Candida albicans* sorotipo A, quando em comparação com a *Candida albicans* sp. Porém, a *Candida albicans* sp se apresentou mais sensível nos primeiros tempos de crescimento, quando até suas 24 horas de crescimento, foi necessário para inibi-la a menor concentração testada, enquanto a menor concentração testada de quitosana para *Candida albicans* sorotipo A foi eficaz apenas até a 15^o hora de crescimento. Os resultados obtidos foram capazes de demonstrar que, independente da hora de crescimento, a quitosana foi mais eficaz que o fluconazol, já que a concentração dessa se apresentava ou igual a do antifúngico já comercializado ou menor que esta.

CONCLUSÃO

No presente estudo a atividade antimicrobiana da quitosana foi comprovada sobre um fungo patógeno humano cujo gênero é responsável pela maioria das infecções fúngicas documentadas, devido à resistência de espécies do gênero *Candida* a antifúngicos. Concluiu-se que a quitosana pode ter tanto caráter fungistático como fungicida, dependendo de sua concentração no meio, bem como o tempo de crescimento do fungo. Notou-se que, em alguns tempos de crescimento, a quitosana se apresentou mais eficaz do que o próprio fluconazol, permitindo-nos levantar a hipótese de que a quitosana seria necessária em menores posologias para combater uma infecção in vivo.

Além de necessários mais estudos sobre a ação antimicrobiana, principalmente antifúngica in vitro da quitosana, devem-se aprofundar estudos para saber se tal biopolímero pode ser utilizado sem toxicidade por humanos no intuito de que futuramente seja possível o uso deste composto como um fármaco para tratamento de micoses.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa PIBIC;

Aos colegas, à professora Thaysa, e à laboratorista Luana, do Laboratório Multidisciplinar da UACS/UFMG (Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Campina Grande), onde este projeto foi desenvolvido e realizado, por todo apoio e contribuição;

À professora Cristina Ruan Ferreira de Araújo pela orientação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente pela execução do projeto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALICKA-RAMISZ, A. et al. Antibacterial and antifungal activity of chitosan. **ISAH**, Warsaw – Poland, v.2, p.406-408, 2005.

BARBEDO, L. S. et al. Candidíase. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **R. Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.4, p. 343-348, out/dez 1999

BENTO, R.A. et al. Potential of chitosan from *Mucor Rouxi* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 583-589, 2009

BIER, O. **Bacteriologia e Microbiologia**. 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1977. 1056p.

BROCK, T. D.; BROCK, K. M. **Basic microbiology with applications**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1978. 608p.

BURKATOVSKAYA, M. et al. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. **Biomaterials**, USA, v. 27, p.4157–4164, 2006.

CHAMI, N. et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 106-111, 2004

COLOMBO, A.L. et al. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.5, p.599-607, 2003.

DIGNANI, M.C., SOLOMKIN, J.S., ANAISSIE, E. **Candida**. In: ANAISSIE, E, MCGINNIS, M.R., PFALLER, M.A. (eds) *Medical Mycology*. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

ELOSIEBO, M. E., "Antimicrobial Activity of Chitosan Against *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Zygosaccharomyces bailii*" (2004). University of Tennessee Honors Thesis Projects. http://trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/733/

FOSTER, L.J.R; BUTT, J. Chitosan films are not antimicrobial. **Biotechnol Lett**, Australia, v.33, p.417–421, 2011.

GAVA, A. J. Métodos de conservação de alimentos. In: _____. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo: Nobel, 1984. cap 2, p.57-58

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G.. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n.3, p. 241-247, 2009.

HAFDANI, F.N; SADEGHINIA, N. A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.74, p257-261, 2011.

HINRICHSEN, S. L. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 325-328, 2009

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001. 1465p.

LIM, S.-H.; HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, USA, v.339, p.313–319, 2004.

LIU, Y. F. et al. Preparations and characterization of glutaraldehyde cross-linked o-carboxymethylchitosan microspheres for controlled delivery of pazufloxacin mesilate. **Biological Macromolecules**, v.41, n.1, p. 87-93, 2007.

MARTINEZ, L. R. Demonstration of Antibiofilm and Antifungal Efficacy of Chitosan against Candidal Biofilms, Using an In Vivo Central Venous Catheter Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v.201, n.9, p.1436-1440, 2010

MICELI, M.H. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**, v.11, p. 142-51, 2011.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e Streptococcus mutans**. Tese (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos-SP: Universidade de São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-19012005-103055/en.php>> [acessado em 26/04/2011].

OLIVEIRA, A.P. et al. Anti-*Candida* Activity of a Chitosan Hydrogel: Mechanism of Action and Cytotoxicity Profile. **Gynecol Obstet Invest**, v.70; p. 322-327, 2010

PAVINATTO, A. **Efeito de características estruturais da quitosana sobre sua interação com filmes de Langmuir como modelo de biomembrana**. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais). São Carlos – SP: Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-01032010-133328/en.php>> [acessado em 26/04/2011].

PAVINATTO, F.J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett**. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais). São Carlos – SP: Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-17122010-152254/es.php>> [acessado em 28/04/2011].

SAKHARKAR, R.K. et al. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas Aeruginosa*. **Int. J. Biol. Sci.**, Singapore, v.5, n.2, 2009.

SANGLARD, D., ODDS, F.C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p.73-85, 2002.

SANTIAGO, L. B. **Avaliação in vitro e in vivo de antissépticos e desinfetantes no controle da linfadenite caseosa**, 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE. 2010 p.42-43

SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **Int J Pharm**. 353(1-2):p.139-48, 2008.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, p. 337-344, 2006

SILVA, G. L. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: Salmonella enterica, Shigella sonnei e Escherichia coli EPEC**. Tese (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos-SP: Universidade de São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006-095954/es.php>> [acessado em 26/04/2011].

TANG, H. et al. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia**, USA, v. 6, p. 2562-2571, 2010.

TAPIA, C. et al. Efecto antifúngico de quitosana de alto peso molecular em cepas de *Candida* sp aislada de muestras clínicas. **Revista Chilena de infectología**, v.26, n.6, 2009

TAYEL, A.A. et al. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p.10-14, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 894p.