

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DANYELLE GOMES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EUGENOL FRENTE AO DNA
GENÔMICO DE *Candida albicans***

Juazeiro do Norte – CE

2019

DANYELLE GOMES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EUGENOL FRENTE AO DNA
GENÔMICO DE *Candida albicans***

Artigo apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a colação de grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro.

Co-orientadora: Esp. Francisca Alves dos Santos.

Juazeiro do Norte – CE

2019

DANYELLE GOMES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EUGENOL FRENTE AO DNA
GENÔMICO DE *Candida albicans***

Artigo apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a colação de grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro.

Co-orientadora: Esp. Francisca Alves dos Santos.

Data de apresentação: 09/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
(Orientadora)

Esp. Francisca Alves dos Santos
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares
(Examinador)

Profa. Ma. Ana Ruth Sampaio Granjeiro
(Examinadora)

*Dedico este estudo a todos que fizeram parte
desta caminhada. Em especial a minha mãe
Maria Laide Gomes.*

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EUGENOL FRENTE AO DNA GENÔMICO DE *Candida albicans*

Danyelle Gomes de Sousa¹

Francisca Alves dos Santos²

Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do eugenol frente ao DNA genômico de *Candida albicans*. Foi realizado um estudo experimental de cunho quantitativo, com a linhagem *Candida albicans* INCQS 40006. O eugenol foi testado em concentrações de 12,5 %, 25%, 50%, 75% e 100%. A substância teste permaneceu em contato com o fungo por 24 horas em meio BHI em estufa microbiológica, em seguida foi realizada a extração do DNA e parte da amostra obtida foi lavada com TE para retirada do Eugenol. O fungo foi colocado em BHI novamente e posto por 24 horas em estufa microbiológica. Ao final as amostras com 100% do eugenol passaram por semeios em Sabouraud Dextrose para testes confirmatório. Dessa forma a partir da eletroforese, que admite avaliar a qualidade do material extraído, preservando suas características e integridade, observou-se no teste de concentração de eugenol (teste 1), no qual o eugenol esteve em contato direto com o patógeno, que em concentrações de iguais ou superiores a 75% da substância teste o patógeno não teve poder proliferativo. No em que se avalia a capacidade do fungo de se recuperar (teste 2), o eugenol foi retirado da amostra notando-se que em 100% da substancia teste o fungo não teve capacidade de se restaurar, ocorrendo por definitivo a morte celular.

Palavras-chave: Eugenol. DNA Fúngico. Morte celular

ACTION OF EUGENOL ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Candida albicans* GENOMIC DNA

ABSTRACT

The aim of this study was action of eugenol antifungal activity against candida albicans genomic DNA. An experimental quantitative study was performed, where the tests were performed with the *Candida albicans* INCQS 40006 strain. Eugenol was tested at concentrations of 12.5%, 25%, 50%, 75% and 100%. The test substance remained in contact with the fungus for 24 hours in the BHI medium in a microbiological greenhouse, then DNA extraction was performed and a portion of the sample was washed with TE to remove Eugenol, the fungus was placed in BHI again and placed for 24 hours in a microbiological greenhouse. At the end the 100% eugenol samples were seeded in Sabouraud Dextrose for confirmatory testing. Thus from the electrophoresis, which admits to evaluate the quality of the extracted material, preserving its characteristics and integrity, it was observed in the eugenol concentration test (test 1), in which eugenol was in direct contact with the pathogen, which in concentrations of 75% or more of the test substance the pathogen had no proliferative power. When evaluating the ability of the fungus to recover (test 2), eugenol was removed from the sample noting that in 100% of the test substance the fungus was unable to restore itself, causing cell death.

Keywords: Eugenol. Fungal DNA. Cell death

1.INTRODUÇÃO

A velocidade em que microrganismos adquirem resistência, tanto ao sistema imune como a medicamentos comerciais é cada vez maior (MENEZES et al., 2009). Dentre eles destaca-se *Candida albicans*, espécie pertencente a microbiota humana (LEVINSON, 2016), mas que também é capaz de tornar-se invasiva levando a contágios sanguíneos e sistêmicos após a ruptura do tecido (GOW; YADAV, 2017).

Essa espécie apresenta uma vasta resistência a antifúngicos conhecidos devido aos seus fortes fatores de virulência, enfatizando a secreção de enzimas hidrolíticas e adesinas, troca fenotípica, dimorfismos e adaptação rápida a temperatura (KHAN et al., 2010), com capacidade de se associar a biofilmes (SARDI et al., 2013).

Fatores genéticos também contribuem fortemente para a proliferação deste microrganismo. A família de genes ALS se sobressai por ter ligação direta com o polimorfismo dos biofilmes (OLIVEIRA; BRUGNETRA; PICCOLI, 2010). Já a expressão de genes HWP1, ALS1, ALS3 está associada à adesão desse fungo (NAILIS et al., 2010).

Alguns estudos demonstram que produtos naturais obtidos de plantas medicinais, podem interagir com o material genético de alguns microrganismos, levando a efeitos antimicrobianos. Isolado do cravo da Índia, o Eugenol já foi descrito por apresentar ação contra fungos (BENNIS et al., 2004).

Este trata-se de uma substância fenólica e volátil caracterizada como antimicrobiano (AFFONSO et al., 2012). Encontrado em espécies da família Mytaceae (BACHIEGA et al., 2012), originária das ilhas Molucas, na Indonésia (SILVESTRI et al., 2015).

O composto já foi descrito com diversas formas de ação, desde a rápida indução anestésica da tilápia do nilo (VIDAL et al., 2008) a antibacteriano (BERALDO et al., 2013), utilizado como antisséptico de higiene bucal (MAZZAFERA et al., 2003), antioxidante (MORAIS et al., 2009) e antiparasitário (UEDA-NAKAMURA et al., 2006).

O Eugenol também foi relatado como um antifúngico em potencial, atuando diretamente na membrana plasmática do patógeno alterando o pH e causando a inativação celular por meio da H⁺-ATPase, proteína dominante que exerce a maior parte das funções fisiológicas do patógeno, sendo primordial na manutenção do equilíbrio eletrolítico do fungo. (AHAMAD et al., 2010)

Além disso, pode atuar também diretamente nos transportadores fúngicos, especialmente nos sítios ativos dos aminoácidos permeases de Tat1p e Gap1p, localizadas na membrana citoplasmática das células de leveduras, modificando assim a sua permeabilidade

ocasionando mudanças na sua conformidade, levando ao extravasamento celular (DARVISHI et al., 2013).

Atividades contra *Candida* sp. mostraram que o mesmo foi capaz de modificar a morfogênese do envelope do patógeno, interferindo em enzimas que catalisam polissacarídeos, prejudicando o desenvolvimento da parede celular (BRAGA et al., 2007).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do eugenol frente ao DNA genômico de *Candida albicans*.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental de cunho quantitativo, com atividades realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Leão Sampaio (UNILEÃO), Juazeiro do Norte– CE, no período de Setembro a Novembro de 2019.

2.2 MICROORGANISMOS

Para realização dos testes antifúngicos, a linhagem usada foi *Candida albicans* INCQS 40006. Para obter amostra fúngica, foi necessário 1mL de cultivo fúngico em meio líquido Saboroud dextrose acrescido de cloranfenicol em tubos distintos de 1,5mL.

2.3 OBTENÇÃO DA SOLUÇÃO TESTE

O composto Eugenol foi obtido da empresa Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, E.U.A. Para os testes de atividade antifúngica, foi utilizado o composto em sua concentração pura (100%) e também preparadas em quatro concentrações: 12,5 %, 25%, 50%, 75%. Para preparo dessas soluções o composto foi diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em água estéril. Foram realizados amostras controles somente com o composto DMSO para evitar possíveis interferências na interpretação do resultado.

2.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DO FUNGO

1. O microrganismo foi recolhido e adicionado a um microtubo contendo 500µL de tampão de lise celular (NaCl 0,15M; Tris – HCl 50M; EDTA 10mM; SDS – 2%; pH 8) e o mesmo foi incubado a 65°C por 1 hora.
2. Foram adicionados 500µL de fenol/clorofórmio (1:1) e agitado em um vórtex por 15 minutos. Este foi centrifugado por 15 minutos a 13000rpm e posteriormente retirado a suspensão aquosa e adicionada a um novo microtubo.
3. A suspensão que continha DNA foi adicionado 400µL de fenol, e agitado no vórtex por 5 minutos e centrifugado por 15 minutos a 13000rpm, a fase aquosa formada, foi exposta a outro método de extração com 400µl de fenol.
4. Ao sobrenadante foi adicionado 1mL de etanol absoluto e este foi armazenado durante o período de 1 hora a - 20°C. Após uma centrifugação de 15 minutos a 13000rpm, o sedimento foi lavado com etanol 70% gelado, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 80µL de água ultrapura livre de DNase.
5. O material foi tratado com 3µl de RNase (Invitrogen, Carlsbad, CA) na concentração de 50µg/mL 30 minutos a 37°C.
6. A qualidade do DNA foi verificada visualmente sob luz UV após eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,5µg/mL de Blue Green Loading Dye I. Os microtubos contendo o DNA foram armazenados a -20°C (ALVES; CAMARGO; GOULART, 2010).
7. Após obtenção das amostras de DNA, cada concentração do composto Eugenol foi colocado em contato com essa amostra por cerca de 24 horas para verificar se há algum tipo de interação com o DNA fúngico. Como controle foi utilizada a amostra de DNA sem Eugenol e para comparação das concentrações foi utilizado o padrão DNA Ladder.

2.5 PREPARO DE GEL DE AGAROSE E ELETROFORESE

Análise em eletroforese em gel de agarose: O preparo do gel de agarose e o procedimento de eletroforese seguem os critérios apresentados por Borda et al., 2016.

2.6 TESTES MICROBIOLÓGICOS

No teste confirmatório de morte celular as estirpes fúngica foram inoculadas em *Brain Heart Infusão* (BHI), incubadas a 37°C por 24 horas. A concentração de inóculo foi padronizada de acordo com a escala McFarland, comparando a turvação do inóculo com o padrão 0,5 na escala, em um dos inoculos foi adicionado 100uL do Eugenol e o outro permaneceu somente

com o meio servindo de controle positivo para o crescimento fúngico. Os inoculos foram utilizados para semeio em Sabouraud Dextrose Agar (SDA – KASVI), para confirma se houve morte celular na concentração de 100mL de Eugenol, o teste foi realizado em duplicada.

Após o primeiro semeio, *Candida albicans* foi lavada com solução tampão TE (Tris - EDTA.) para retirada do Eugenol e colocada novamente em meio BHI, aguardando mais 24horas em estufa a 37°C, para avaliar a sua capacidade de recuperação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 pode-se observar o DNA da *Candida albicans* após o período de 50 minutos em gel de agarose, nas laterais tem-se dois tipos de DNA LADDER, em que a partir da sua emissão de luz vista sob a luz UV se tem em nanograma por microlitro a quantidade de DNA presente naquela banda.

Na parte superior se tem o controle positivo, com 9ug/uL de DNA. Em sequência se tem as concentrações de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do eugenol

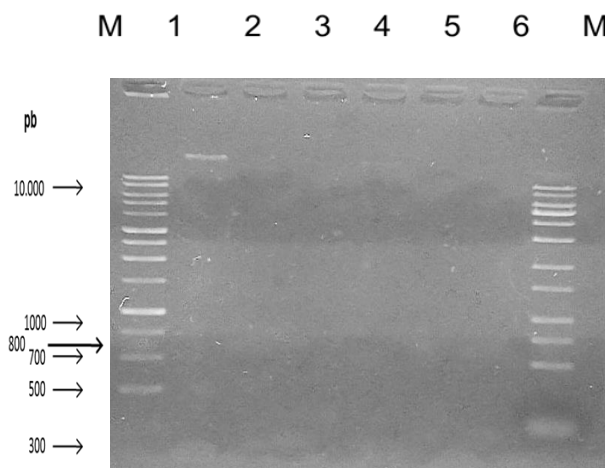
No teste 1 foi avaliado o Eugenol em diferentes quantidades, sendo observado na figura 1, que em concentrações iguais ou superiores a 75% da substância teste, o patógeno não teve poder replicativo.

Em concentrações iguais ou inferiores a 50% do Eugenol notou-se uma redução no seu crescimento, mas não suficiente para inibir por total a sua proliferação.

Nas concentrações iguais ou inferiores a 50% da substancia teste observa-se a presença de DNA fúngico, porque *Candida albicans* apresenta diferentes mecanismos genéticos ainda não esclarecidos que a torna resistente. Sua rápida adaptação ao ambiente é diretamente proporcional ao seu programa de transcrição, tornando-a cada vez mais estável (HUBE, 2004).

Figura 1: DNA fúngico aplicado ao gel de agarose contendo o inoculo em contato direto com o eugenol em diferentes concentrações.

Fonte: primária



M= Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Fisher Scientific International Inc.); 1= Controle positivo; 2: Eugenol em 12,5%, 3:Eugenol em 25%; 4: Eugenol em 50%; 5: Eugenol em 75%; 6: Eugenol em 100%.

Diversos trabalhos microbiológicos realizados com o eugenol, mostram sua capacidade de inibir o crescimento da *Candida albicans* (SCHMIDT et al, 2007) resultados condizentes com esse trabalho que observou em gel de agarose que em concentrações iguais ou superior a 75% não se teve concentrado DNA, demonstrando que ocorreu uma interrupção no desenvolvimento fúngico.

O Eugenol desempenha um efeito anticandida a partir de sérios danos ao seu envelope, modificando sua morfogênese e seu desenvolvimento celular (KHAN et al., 2019). O mesmo resultado, demonstrando que o Eugenol apresenta atividade anticandida, porém acreditam que a destruição do patógeno não está associada a sua parede celular, mas sim a inativação da síntese de ergosterol e aumento na produção de radicais livres. (DA SILVA et al., 2017)

No teste 2, avaliou-se a capacidade do fungo de se recuperar após o efeito do Eugenol. Após o teste I, o DNA foi lavado com solução tampão TE para retirada da substância e em seguida colocado em 1mL de BHI e incubado novamente por 24 horas em estufa microbiológica variante de 36 – 37°C.

Destaca-se que frente a 100% de Eugenol o fungo não teve capacidade de se restaurar, mesmo após ser dado a ele nutrientes e temperatura adequadas para o seu desenvolvimento. A atuação do eugenol nas células aderentes e consequentemente no biofilme formado pela *Candida albicans* dependia diretamente da concentração do mesmo, resultado este observado nos testes deste trabalho (HE et al., 2007).

O Eugenol desempenha ação contra a formação de biofilmes, quando adicionado antes do cultivo, o mesmo age antes que ele seja formado, e quando adicionado após a formação do biofilme, a substancia foi capaz de interromper a sua progressão, através da eletromicrografia

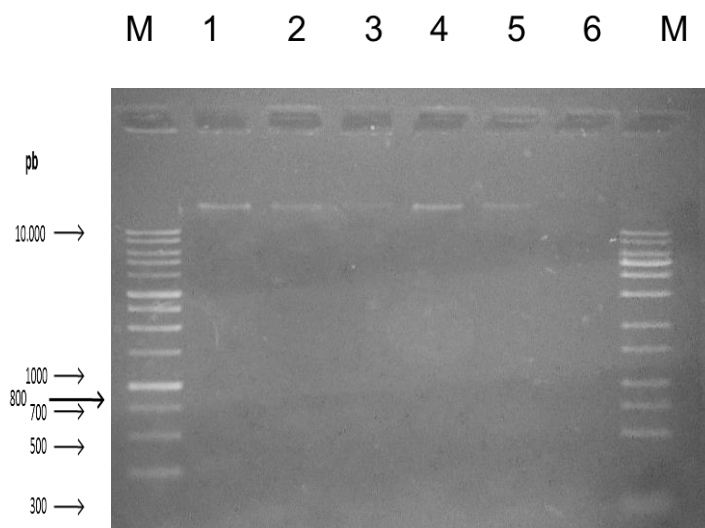
observaram o encolhimento das membranas celulares das células sésseis (células com baixos níveis de esterol), ainda sendo relatado o seu sinergismo com o fluconazol (medicamento de uso antimicótico) (KHAN; AHMAD, 2011).

Os compostos fenólicos possuem ação antifúngica através da inibição enzimática do tipo não competitiva, interrompendo a produção de micotoxinas, como a aflatoxina (toxina presente em alimentos), capaz de causar danos à saúde do ser humano e nas peroxidases lipídicas bloqueando o estresse oxidativo por meio da não formação dos peróxidos, dificultando assim a sua biossíntese (OLIVEIRA et al., 2007).

Na figura 2 pode-se observar diferentes contrações do DNA genômico através da luz emitida sob luz UV, sendo o controle positivo localizado do lado esquerdo superior fortemente positivo, seguido das concentrações 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% de Eugenol. Mostrando que em 100% não se obteve nenhum concentrado de DNA.

Figura 2: Teste 2 em gel de agarose no processo de eletroforese

Fonte: primária



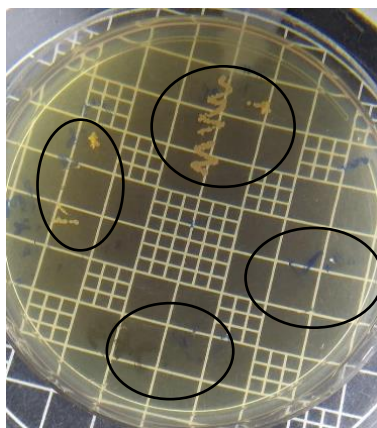
M= Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Fisher Scientific International Inc.); 1= Controle positivo; 2: Eugenol em 12,5%, 3:Eugenol em 25%; 4: Eugenol em 50%; 5: Eugenol em 75%; 6: Eugenol em 100%.

Em infecções causadas por *Candida* sp, a metodologia mais usada é a de cultivo em diferentes meios, porém essa acarreta uma certa demora para adquirir os resultado além disso, sofre facilmente interferências do meio, como contaminações, por exemplo. Em decorrência do tempo esperado. Diante disso a ciência evoluiu para métodos mais rápidos com menores riscos de contaminação, como a PCR ou ainda a qPCR, que se trata da PCR em tempo real, na qual se tem resultados quantitativos e qualitativos em três horas (KOEHLER et al., 2016).

Para os testes confirmatórios de morte celular, para o teste 1, que avalia o eugenol em diferentes concentração em contato direto com o inoculo, pode-se notar na figura 3, que não houve crescimento fúngico confirmando em semeio o que foi visto em eletroforese, onde na concentração de 100% a substancia teste foi fungiestatico, mostrando que o eugenol tem capacidade de interromper a progressão de crescimento fúngico.

Figura 3: Semeio confirmatório da *Candida albicans* em contato direto com 100% do eugenol.

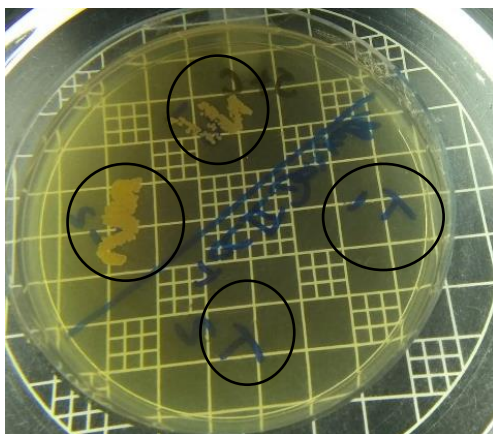
Fonte: primária



Para o teste 2, realizado em duplicata, os inoculos foram centrifugados, ficando na base do eppendorf células fúngicas, que foram lavadas com solução de tampão TE para retirada do eugenol, pode-se notar na figura 4 *Candida albicans* não teve capacidade de se recuperar, mostrando que o eugenol na concentração de 100% é fungicida, mostrando que o eugenol em sua concentração pura matou completamente o patógeno, sem a capacidade de se recuperar.

Figura 4: Semeio confirmatório da *Candida albicans* após a lavagem com TE, adicionada ao BHI por 24 horas.

Fonte: primária



4. CONCLUSÃO

Diante das análises realizadas, constata-se que o Eugenol desempenha efeitos fungoestático e fungicida sob o DNA da *Candida albicans* em diferentes concentrações, destacando que em 100% o mesmo teve ação fungicida, em que o fungo não teve capacidade de se recuperar, mesmo após a retirada da sustância e dado a ele boas condições para sua proliferação.

Em contrações inferiores observou-se apenas um retardo na proliferação fúngica, pois, *Candida albicans* detêm diversos mecanismos de resistência, seja a substancias medicamentosas, fitoterápicos ou sistema imune.

Dessa forma, este trabalho agrega a comunidade científica mais informações sobre o potencial antifúngico do eugenol, sendo necessários mais estudos para que o mesmo possa vir a ser considerado um fármaco comercial para tratamento de infecções por *Candida albicans*

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R.S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, 2012.
- AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, 2010.
- ALVES, I. A.; CAMARGO, F. P. de; GOULART, L. S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, 2010.
- BACHIEGA, T. F. et al. Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 4, 2012.
- BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, 2004.
- BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-Índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, 2013.
- BORDA, C. C. et al. Análise da eficiência do gel de agar-agar na eletroforese de DNA. **Atas de Ciências da Saúde**, v. 3, n. 3, 2016.
- BRAGA, P. C. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, n.6, 2007.
- DA SILVA, I. C. G. et al. Atividade antifúngica de Eugenol e sua associação com nistatina em *Candida albicans*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 2017, 17.1: 1-8.
- DARVISHI, E. et al. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **PloS One**, v. 8, n. 10, 2013.
- GOW, N. A.; YADAV, B. Microbe profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. **Microbiology**, v. 163, n. 8, 2017.
- He, M., Du, M., Fan, M., & Bian, Z. (2007). In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia*, 163(3), 137-143.
- HUBE, B. From commensal to pathogen: stage-and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, v. 7, n. 4, 2004.
- KHAN, M. S. A. et al. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. In: Ahmad I.; Owais M.; Shahid M.; Aqil F. **Combating Fungal Infections**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.
- KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, 2011.
- Khan, S. N. et al. "Atividade fungicida sinérgica com baixas doses de eugenol e anfotericina B contra *Candida albicans*". **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica** v. 518, n 3, 2019.

KOEHLER, A. et al. Identificação de três espécies de Candida por PCR em tempo real. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 6, n. 1, 2016.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. McGraw Hill Brasil, 13ªed. 2016.

MAZZAFERA, P. et al. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 2, 2003.

MENEZES, T. O de A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de Candida albicans. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, 2009.

MORAIS, S. M. de et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, 2009.

NAILIS, H. et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in Candida albicans biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, 2010.

OLIVEIRA, M. dos S. et al. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alim. Nutr.** v.18, n.3, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M. de; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n.3, 2010.

SARDI, J. C. O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, 2013.

SCHMIDT, E., JIROVETZ, L., WLCEK, K., BUCHBAUER, G., GOCHEV, V., GIROVA, T.; GEISSLER, M. 2007). Antifungal activity of eugenol and various eugenol-containing essential oils against 38 clinical isolates of Candida albicans. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. 5, 2007.

SILVESTRI, J. D. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (Eugenia caryophyllata Thunb.). **Ceres**, v. 57, n. 5, 2015.

SOARES, L. A. L. et al. **A facilitação da aprendizagem significativa do tema “Reino Fungi” no segundo segmento do ensino fundamental**. 2014. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, 2014.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, 2006.

VIDAL, L. V. O. et al. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, 2008.