

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO LÍQUIDO REPELENTE EM DUAS ESPÉCIES DE OPILIÕES CAVERNÍCOLAS: GONIOSOMA ALBISCRIPITUM E GONIOSOMA SP. (OPILIONES:GONYLEPTIDAE)

Marcos Enoque Leite LIMA¹⁻²; Robson de Almeida ZAMPAULO²; Paulo Roberto H. MORENO¹

¹ - Instituto de Química – Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes 748 B 11T, 05585-010, São Paulo-SP - e-mail: enoque@iq.usp.br.

² - Grupo de Estudos Ambientais da Serra do Mar (GESMAR)

Abstract

The harvestman species from the family Gonyleptidae (suborder Laniatores) are known to produce a defensive secretion containing benzoquinones. In this study, the defensive secretions produced by two neotropical harvestmen species, *Goniosoma albiscrriptum* and *Goniosoma sp.*, were analyzed regarding their chemical composition and their effectiveness against several pathogenic microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), and *Candida albicans* (ATCC 10231). These secretions contained three benzoquinones: 2,3-dimethyl-1,4-benzoquinone, 2-ethyl-3-methyl-1,4-benzoquinone, 2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone; and two hydroquinones: 2,3-dimethyl-hydroquinone and 2,3,5-trimethyl-hydroquinone. All the test microorganisms were susceptible to the secretions. The Gram negative bacteria, *E. coli* and *P. aeruginosa*, and the yeast, *C. albicans*, displayed less toxic effect than *S. aureus*.

1. Introdução

No Brasil são descritas aproximadamente 950 espécies de opiliões, considerada a maior diversidade dentre as cerca de 7.000 encontradas no mundo (COKENDOLPHER & LEE, 1993 *apud* MACHADO, 2002). Os estados de São Paulo e Rio de Janeiro são aqueles que concentram o maior número de espécies conhecidas, 232 e 216 respectivamente. Estas regiões abrigam quase metade da fauna opiliológica já estudada, sendo que a grande maioria das espécies ocorre na faixa da Floresta Atlântica (PINTO-DA-ROCHA, 1999).

De acordo com SHULTZ, 1990 (*apud* HARA, 2005), este grupo é caracterizado pelas seguintes autapomorfias: alongamento do segundo par de pernas para uso tátil; articulação vípica entre o trocanter e o fêmur; presença de estigmas traqueais pareados no segmento genital; presença de pênis e de glândulas odoríferas. Outras características deste grupo são a presença de opistossoma largamente fundido ao prossoma, não formando um pedicelo, quelíceras trisseguimentadas e pernas geralmente longas.

A ordem Opiliones é dividida em quatro subordens: Cyphophthalmi, Dyspnoi, Eupnoi e Laniatores. Os Laniatores possuem as mais diferentes formas e tamanhos, constituindo a maior subordem com mais de 3900 espécies descritas principalmente nas regiões tropicais. Esta subordem apresenta como principais sinapomorfias os pedipalpos robustos e raptoriais e o esterno longo e estreito (MARTENS, 1976; 1986; GIRIBET et al., 1999 *apud* MENDES, 2005) sendo que a família

Gonyleptidae representa quase 90% (200spp.) das espécies paulistas.

As espécies desse grupo geralmente são fotofóbicas, movendo-se durante a noite com hábitos onívoros, podendo se alimentar de pequenos organismos vivos, de fungos, de matéria orgânica em decomposição ou, ainda, de vegetais. Não realizam digestão externa, sendo que o alimento é capturado com os pedipalpos e transportado para as quelíceras que trituram o alimento. Para se orientarem no ambiente, elas utilizam o segundo par de pernas, que são mais alongadas e possuem função sensorial. Ao longo das margens laterais anteriores da carapaça se encontram aberturas para um par de glândulas exócrinas, que produzem uma secreção repelente, a qual é composta por álcoois, aldeídos, cetonas fenóis e quinonas, isolados ou em combinação (POMINI, 2006). A forma de eliminação desse material pode ocorrer através de excreção de gotículas que extravasam por um sulco na porção lateral do escudo podendo ser “pincelado” pelas patas do animal e esfregado sobre o predador ou, mesmo, liberado na forma de spray (SOARES, 1945).

Estudos em laboratórios têm demonstrado a capacidade repelente dessa secreção constituída por substâncias de alta volatilidade e irritabilidade para invertebrados e vertebrados tais como formigas, aranhas e anuros (GADEA et al., 2003; CARRERA et al. & WILLEMART, 2005). Apesar do seu papel de defesa, a produção desse líquido secretor, aparentemente, é comprometida durante os períodos de reprodução como observado em *Acutisoma*

longipes. Apesar da grande diversidade, poucas espécies foram estudadas do ponto de vista químico (HARA 2001; WILLEMART, 2005; POMINI, 2006).

Apenas duas espécies do gênero *Goniosoma* foram estudadas quanto à composição química do líquido excretado pela glândula de defesa: *G. spelaenum* (espécie brasileira que ocorre na região do Vale do Ribeira, São Paulo) e *G. longipes* (espécie que ocorre na região de Atibaia em cavernas graníticas). Nestas espécies, o líquido secretado tinha como compostos majoritários a 2-etil-1,4-benzoquinona e a 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona (GNASPINI & CAVALHEIRO, 1998; POMINI, 2006).

COKENDOLPHER (1987) sugeriu que essa estratégia de defesa também pudesse evitar o estabelecimento de microrganismos parasitas, como bactérias ou fungos. No entanto, não encontramos qualquer trabalho que confirmasse a capacidade antimicrobiana destas substâncias.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a composição química das secreções de defesa dos opiliões cavernícolas *Goniosoma albiscriptum* e *Goniosoma* sp. e testar sua capacidade antimicrobiana frente a quatro espécies de microrganismos.

3. Métodos

3.1 Opiliões estudados

No interior das cavidades Canhabura I e II (SP-515 e 525/CNC-SBE) foram encontradas duas espécies da família Gonyleptidae (subfamília Goniosomatinae), pertencentes ao gênero *Goniosoma*: *G. albiscriptum* (Figura 1) e *Goniosoma* sp. (Figura 2). Este grupo sofreu uma alteração recente, proposta por Silva (2002), ainda não publicada. Preferiu-se, portanto adotar a classificação usual até o momento.

A seguir são apresentadas as duas espécies de opiliões troglóxenos analisados utilizados neste trabalho:

1. *Goniosoma* sp.: material enviado para identificação ao Prof. Dr. Ricardo Pinto-da-Rocha (Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo-USP), sendo considerado como uma nova espécie para gênero e se encontra em fase de descrição (Figura 1).



Figura 1. *Goniosoma* sp.

2. *Goniosoma albiscriptum*: Sua ocorrência é assinalada na Serra do Mar (SP). Esta espécie é encontrada em abrigos de rochas ao longo do leito de riachos e em grutas graníticas (Fotografia 2).



Figura 2. *Goniosoma albiscriptum*
(Mello-Leitão, 1932).

3.2 Coleta do líquido repelente

As secreções de defesa de *Goniosoma* sp. e *G. albiscriptum* foram realizadas pressionando-se as glândulas produtoras situadas na região anteropronotal dos animais. O líquido foi coletado com o auxílio de micropipeta (0,5 - 10 μ L) sendo, posteriormente, acondicionado separadamente de acordo com a espécie e sexo. Após determinação do volume coletado, o líquido foi transferido para tubos eppendorf contendo 50 μ L de metanol.

3.3. Determinação da atividade antimicrobiana dos líquidos repelentes dos opiliões

Os líquidos repelentes foram testados em modelos para bactérias Gram Positiva - *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* (ATCC 6538), Gram Negativas - *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), um fungo leveduriforme - *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para cada ensaio, os microrganismos foram incubados previamente em tubos inclinados Tryptose Soya Agar (TSA, Difco) para bactérias a 37°C e Sabouraud Dextrose Ágar (SDA, Difco) para os fungos a 25°C por 24 h. As culturas obtidas dos tubos inclinados foram re-suspendidas em solução salina 0,85%. As suspensões microbianas obtidas foram diluídas seriadamente com solução salina e inoculadas em meio TSA e SDA, para determinação da concentração de microrganismos. A suspensão microbiana de concentração adequada foi, então, diluída em meio de cultura líquido TSB (TSB – Tryptose Soya Broth) e SDB (SDB – Sabouraud Dextrose Broth), de modo que a concentração final de microrganismos em cada poço da microplaca apresentasse um número de 200 a 400 UFC/200 µL.

A atividade antimicrobiana foi determinada através da diluição seriada dos líquidos repelentes em DMSO/MeOH (1:1V/V), sendo inoculados 10 µL dessas diluições em 190 µL das respectivas suspensões microbianas, os controles positivos utilizados foram cloranfenicol e amicacina para bactérias e nistatina para o fungo, todos na concentração de 1mg/mL e como controle negativo foram utilizados 10 µL do veículo de diluição dos líquidos repelentes. Após distribuição das respectivas amostras e microrganismos, as microplacas foram incubadas em estufa por 48 h, a 25°C para *C. albicans* e 24 h, a 35°C, para os demais microrganismos. Após o período de incubação, a porcentagem de inibição do crescimento dos microrganismos foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro para microplacas (SLT Spectra) a 630 nm. A menor concentração da amostra testada capaz de inibir o desenvolvimento microbiano foi admitida como sendo Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após a determinação da CIM, o conteúdo dos poços, onde não foi observado crescimento, foi plaqueado em meio de cultura TSA para bactérias e SDA para o fungo e, posteriormente, incubado na temperatura e tempo adequados para os respectivos microrganismos para se obter a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) das amostras testadas. A CBM e a CFM foram consideradas como a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de bactérias ou fungos viáveis em 99,9%. (LENCZEWSKI et al, 1996; MATILA, 1987; SALIE et al 1996; WILLINGER et al 2000; DEVIENNE et al 2002).

3.4. Análise da Composição Química dos Líquidos Repelentes por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

A análise da composição química foi realizada com 10 µL das soluções iniciais de líquidos repelentes diluídas em 500 µL de metanol.

A análise consistiu na injeção de 2 µL das amostras em um Cromatógrafo a gás (Agilent modelo 7683 Series), acoplado a espectrômetro de massas (Agilent 5973 Network). A separação cromatográfica foi realizada em coluna HP-5MS (25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5% de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura). Durante a análise, a temperatura do injetor foi programada para 250°C e o forno ajustado à temperatura inicial de 100°C, mantida durante 1 min; após o período inicial, a temperatura foi elevada com uma taxa de 5°C/min, até 200°C sendo, então, a taxa de incremento aumentada para 15°C/min até atingir a temperatura de 290°C sendo mantida essa temperatura por 10 min. O espectrômetro de massas foi regulado para operação com energia de ionização de 70 eV e uma temperatura de interface de 230°C. A identificação dos componentes foi baseada na comparação com espectros de massas registrados em banco de dados do aparelho (Wiley 25) e dos espectros obtidos para os compostos de defesa de outras espécies de opiliões (POMINI, 2006).

4. Resultados

4.1 Análise da Composição Química dos Líquidos Repelentes.

A análise por CG-EM das secreções repelentes de *G. albiscriptum*, machos e fêmeas, revelou a presença de três benzoquinonas: 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona (1), 2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona (2), e 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona (3); e de duas hidroquinonas: 2,3-dimetil-hidroquinona (4) e 2,3,5-trimetil-hidroquinona (5) (Figura 3). As proporções destes compostos nas secreções apresentou uma ligeira variação entre os indivíduos machos e fêmeas (Tabela 1). A segunda espécie analisada, *Goniosoma* sp., apresentou uma composição similar aquela observada para *G. albiscriptum*, não sendo detectados os compostos 3 nos líquidos de machos e fêmeas dessa espécie, e 5, na secreção dos machos (Tabela 1).

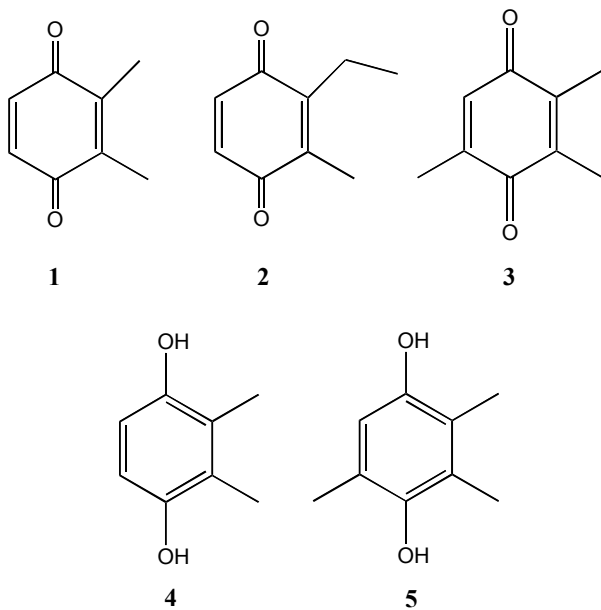


Figura 3. Compostos detectados na secreção repelente de *Goniosoma* sp. e *G. albiscriptum*, machos e fêmeas. (1) 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona; (2) 2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona; (3) 2,3,5-trimetil-1,4-benzoquinona; (4) 2,3-dimetil-hidroquinona; (5) 2,3,5-trimetil-hidroquinona.

Tabela 1. Composição relativa dos líquidos repelentes de *Goniosoma albiscriptum* e *Goniosoma* sp., machos e fêmeas, através da análise por CG-EM.

Composto	<i>G. albiscriptum</i> (%)		<i>Goniosoma</i> sp. (%)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
1	53,5	62,2	74,5	59,7
2	11,1	14,0	13,7	21,3
3	2,1	2,7	-	-
4	27,8	17,3	11,8	15,1
5	5,4	3,8	-	3,9

4.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Líquidos Repelentes.

Todos os microrganismos-teste apresentaram susceptibilidade aos líquidos repelentes de ambas as espécies avaliadas. A secreção com menor atividade foi aquela obtida dos indivíduos machos de *C. albiscriptum* (Tabela 2). A maior atividade, tanto para bactérias como para o fungo, foi obtida para as secreções de machos e fêmeas de *Goniosoma* sp. (Tabela 2 e 3). A bactéria *P. aeruginosa* apresentou a maior resistência aos efeitos tóxicos dessas secreções.

Tabela 2. Atividade antibacteriana dos líquidos repelentes de *Goniosoma albiscriptum* e *Goniosoma* sp. frente a organismos Gram (+), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, e Gram (-), *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*.

Espécie	<i>S. aureus</i> (nL/mL)		<i>E. coli</i> (nL/mL)		<i>P. aeruginosa</i> (nL/mL)		
	CIM*	CBM**	CIM	CBM	CIM	CBM	
<i>G. albiscriptum</i>	machos	> 4787,5	> 4787,5	> 4787,5	> 4787,5	> 4787,5	> 4787,5
	fêmeas	< 124,5	> 249,0	< 124,5	> 249,0	249,0	> 6225,0
<i>Goniosoma</i> sp.	machos	< 30,5	> 61,0	30,5	> 61,0	< 30,5	> 1525,0
	fêmeas	< 23,5	> 47,0	< 23,5	124,5	47,0	1175,0

* Concentração Inibitória Mínima

** Concentração Bactericida Mínima

Tabela 3. Atividade Antifúngica dos líquidos repelentes de *Goniosoma albiscriptum* e *Goniosoma* sp. frente a *Candida albicans*.

Espécie		<i>C. albicans</i> (nL/mL)	
		CIM*	CFM**
<i>G. albiscriptum</i>	machos	> 4787,5	> 4787,5
	fêmeas	< 249,0	> 124,5
<i>Goniosoma</i> sp.	machos	< 30,5	> 1525,0
	fêmeas	< 23,5	> 124,5

* Concentração Inibitória Mínima

** Concentração Bactericida Mínima

5. Discussão

Os líquidos repelentes das espécies analisadas apresentavam como compostos majoritários derivados de 1,4-benzoquinonas e de suas respectivas hidroquinonas. A presença dessas estruturas era esperada em espécies pertencentes à família Gonyleptidae, conforme o padrão filogenético anteriormente encontrado para a composição química das secreções de defesa dentro da subordem dos Laniatores (ESTABLE et al., 1955; FIESER & ARDAO, 1956; ROACH et al., 1980; ACOSTA et al., 1993; EISNER et al., 2004). As mesmas substâncias foram anteriormente isoladas das secreções de defesa de duas outras espécies de *Goniosoma*, *G. spelaeum* (GNASPINI & CAVALHEIRO, 1998) e *G. longipes* (POMINI, 2006). Nessa última, foi isolada pela primeira vez, como produto natural, a 2-etil-3-metil-1,4-benzoquinona (2), também presente nas espécies em estudo, *Goniosoma* sp. e *G. albiscriptum*.

As propriedades cáusticas e irritantes destas substâncias odoríferas podem fazer com que os predadores invertebrados desistam do ataque e executem vigorosas atividades de limpeza (EISNER & MEINWALD, 1966). Recentemente, EISNER et al. (2004) demonstraram que a secreção de *A. aculeatus* (Pachylinae- Gonyleptidea) era um excelente repelente da formiga *Formica exsectoides*. Em *G. longipes*, cuja composição do líquido repelente era similar ao encontrado para as espécies em estudo, esta secreção foi efetiva em repelir aranhas da família Ctenidae e cinco espécies de formigas e ainda induzia anuros (*Proceratophrys*

boei) regurgitar insetos quando estimulados com as secreções (MACHADO et al., 2003).

A vida em um ambiente quente e úmido também expõe *Goniosoma* sp. e *G. albiscriptum* ao ataque de microrganismos patogênicos tais como bactérias e fungos entomopatogênicos. Anteriormente, Ruther et al. (2001) descreveram a capacidade de inibição do crescimento de *E. coli* para 1,4-benzoquinona e 2-metil-1,4-benzoquinona (toluilquinona), isoladas das secreções de defesa de *Melolontha hippocastani*, não sendo possível confirmar esta atividade para microrganismos patogênicos nas concentrações determinadas nas larvas dessa espécie. Os resultados apresentados neste estudo demonstram que as quinonas presentes no líquido secretor possuem uma potente atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram positivas e negativas como para fungos. De uma maneira geral os líquidos secretores de ambas as espécies apresentaram uma toxicidade mais pronunciada frente à bactéria Gram positiva *S. aureus*, que era completamente eliminada com uma concentração do líquido secretor da ordem de partes por milhão (ppm). Por outro lado, as bactérias Gram negativas e o fungo foram menos sensíveis às secreções. Para esses microrganismos, foi possível observar a inibição do crescimento em faixas de concentração semelhantes àquelas encontradas para *S. aureus*, mas os efeitos tóxicos só eram observados em concentrações muito maiores. Entretanto, para que se possa confirmar o eventual papel de defesa contra microrganismos é necessário testar a atividade dessas substâncias frente a bactérias e fungos patogênicos dessas espécies.

6. Referências

- ACOSTA, L. E., PORETTI, T. I., and MASCARELLI, P. E. The defensive secretions of *Pachyloidellus goliath* (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae). *Bonn. Zool. Beitr.*, v.44, p. 19-31, 1993.
- COKENDOLPHER, J. C. Observations on the defensive behaviors of a Neotropical Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones). *Rev. Arachnol.*, v.7, p. 59-63, 1987.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p. 166-168, 2002.
- EISNER, T., ROSSINI, C., GONZA' LEZ, A., and EISNER, M. 2004. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *J. Exp. Biol.*, v. 207, p. 1313-1321, 2004.
- ESTABLE, C., ARDAO, M. I., BRASIL, N. P.; FIESER, L. F. Gonyleptidine. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 77, p. 4942, 1995.
- FIESER, L. F.; ARDAO, M. I. Investigation of the chemical nature of Gonyleptidine. *J. Chem. Ecol.*, v. 78, p. 774-781, 1956.



- GADEA, C. A. T.; ALONSO-FERREIRA, B. Qué tan eficaces son las defensas químicas de *Acanthopachylus aculeatus* (Opiliones: Gonyleptidae)? Estudio preliminar frente a dos potenciales depredadores. In: Encontro de Aracnólogos do Cone Sul, 4, São Pedro, 2003, *Resumos*, p. 252, 2003.
- GNASPINI, P.; CAVALHEIRO, A. J. 1998. Chemical and behavioral defenses of a Neotropical cavernicolous harvestman: *Goniosoma spelaum* (Opiliones: Laniatores: Gonyleptidae). *J. Arachnol.*, v. 26, p. 81-90, 1998.
- HARA, M. R.. *Estudo de caracteres de defesa (comportamentais e químicos) de opiliões em reação à sua filogenia (Arachnida: Opiliones)*. São Paulo, 2001. 144 p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.
- HARA, M. R. *Revisão sistemática e análise filogenética do gênero Eusarcus Perty 1833 (ARACHNIDA, OPILIONES, LANIATORES)*. São Paulo, 2005. 214 p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo,
- LENCZEWSKI, M. E., McGAVIN, S. T., VANDYKE, K. Comparison of automated and traditional minimum inhibitory concentration procedures for microbiological cosmetic preservatives. *J. AOAC Int.*, v.79, n° 6, 1996, 1294-1299.
- MACHADO, G. *História natural e ecologia comportamental de opiliões (Arachnida:Opiliones): defesa, socialidade e investimento parental*. 2002. 148p. Tese (Doutorado em Zociências) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- MACHADO, G.; POMINI, A. M.; MARSAIOLI, A. J. A produção de ovos compromete a defesa química no opilião *Acutisoma longipes* (opiliones:Gonyleptidae). In: Encontro de Aracnólogos do Cone Sul, 4, São Pedro, 2003, *Resumos*, p. 252, 2003.
- MATILA, T. A modified Kelsey-Sykes method for testing disinfectants with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride reduction as an indicator of bacterial growth. *J.Appl. Bacteriol.*, v. 62, p. 551-554, 1987.
- MENDES, A. C. *Revisão sistemática e análise filogenética de Heteropachylinae, Kury, 1994 (Arachnida, Opiliones, Gonyleptidae)*. Rio de Janeiro, 2005. 161p. Dissertação de Mestrado - Museu Nacional - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PINTO-DA-ROCHA, R. Opiliones. In: Brandão, C. F. F. & Canello, E. M. (eds) *Invertebrados Terrestres*. Vol.5. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XX. (Joly, C. A & Bicudo, C. E. M. orgs). São Paulo, FAPESP. p. 35-44, 1999.
- POMINI, A. M. *Semioquímicos produzidos por bactérias fitopatogênicas e opiliões brasileiros*. Campinas, 2006. 256 p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ROACH, B., EISNER, T.; MEINWALD, J. Defensive substances of opilionids. *J. Chem. Ecol.*, v. 6, p. 511-516, 1980.
- RUTHER, J.; PODSIADLOWSKI, L.; HILKER, M. Quinones in cockchafers: additional function of a sex attractant as an antimicrobial agent. *Chemoecology*, 11, p. 225–229, 2001.
- SALIE, F. EAGLES, P.F.K.; LENG, H.M.J. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *J. Ethnopharmacol.*, v. 52, p. 27-33, 1996.
- SOARES, B.A.M. *Considerações em torno da sistemática dos opiliões*. 1954, 46p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Departamento de Zoologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1954.



WILLEMART, R. H. *Estruturas e capacidades sensoriais, aberturas glandulares, dimorfismo sexual e defesa primária em opiliões (ARACHNIDA, OPILIONES)*. São Paulo, 2005. 193 p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

WILLINGER, B. APFALFER, P. HIRSCHL, A. M. MAKRISTATHIS, A. ROTTER, M. SEIBOLD, M. Suceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest \square . *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 38, p. 11-15, 2000.