



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

GIOVANA CLÁUDIA BONI

**Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados
isolados de diferentes espécies de *Mentha*.**

Piracicaba

2016

GIOVANA CLÁUDIA BONI

**Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados
isolados de diferentes espécies de *Mentha*.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental, na Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Giovana Cláudia Boni e orientada pelo(a) Prof. Dr. José Francisco Höfling.

Piracicaba

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B641a Boni, Giovana Cláudia, 1985-
Avaliação da atividade anti-*Candida* de compostos purificados isolados de diferentes espécies de *Mentha* / Giovana Cláudia Boni. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Jose Francisco Hofling.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Mentha*. 2. Biofilme. 3. *Candida*. I. Hofling, Jose Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Titulo em outro idioma: Evaluation of anti-*Candida* activity by purified compounds isolated from different species of *Mentha*

Palavras-chave em inglês:

Mentha

Biofilms

Candida

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Jose Francisco Hofling [Orientador]

Natália Leal Vizoto

Karina Cogo Müller

Data de defesa: 26-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2016, considerou a candidata GIOVANA CLÁUDIA BONI aprovada.

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

PROF^ª. DR^ª. NATÁLIA LEAL VIZOTO

PROF^ª. DR^ª. KARINA COGO MÜLLER

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

À minha Família

Em especial aos meus pais Ademir e Sandra os quais são os responsáveis por todo meu crescimento como ser humano, pelo amor, paciência e incentivo a mim dedicados em todas minhas escolhas.

Ao meu orientador

José Francisco Höfling pela orientação, confiança, ensinamentos e amizade.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e Universidade Estadual de Campinas, pela excelência em ensino e pesquisa.

Aos Professores da área Dr. José Francisco Höfling, Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner e Dr. Rafael Nobrega Stipp pelo aprendizado e conhecimento transmitidos.

Às Professoras Natália Leal Vizoto e Karina Cogo Müller por aceitarem compor a banca examinadora.

Às Professoras Tarsila Mendes de Camargo e Flávia Sammartino Mariano por aceitarem compor a banca examinadora suplente.

Às Professoras Priscila de Laet Santana, Cinthia Pereira Machado Tabchoury e Janaina Sardi por aceitar compor a banca do exame de qualificação.

Aos Técnicos do Laboratório Valéria e Anderson pelo auxílio nas atividades relacionadas ao desenvolvimento do meu trabalho.

Aos companheiros de laboratório e amigos Thaís O., Janaína, Thaís H., Erika, Talita, Josianne, Jeferson, Manoel, Felipe, Rodrigo. Agradeço o conhecimento compartilhado e convivência.

Às amigas especiais Simone, Marcelle, Paula, Lívia, pelo companheirismo, amizade, conhecimento compartilhado e convivência. Em especial agradeço a Simone pela grande amizade, pelas orientações durante os trabalhos desenvolvidos, pela paciência e atenção comigo e por transmitir seus conhecimentos.

Aos meus irmãos Fábio e Juliano pelo apoio que sempre me deram.

RESUMO

Plantas medicinais tem sido alvo de estudos na descoberta de novos fármacos, por serem fontes de compostos potencialmente bioativos que atuam na manutenção da saúde humana. A descoberta de novas substâncias antimicrobianas derivadas de produtos naturais, são importantes no controle de microrganismos, principalmente, devido ao aumento de casos de resistência a antimicrobianos convencionais. Nesse sentido, leveduras do gênero *Candida* tem se tornado um problema a saúde pública nas últimas décadas devido ao aumento de infecções denominadas candidoses. *Candida* spp. possui mecanismos de virulência, como o polimorfismo e formação de biofilme, que facilitam o desenvolvimento da infecção e dificultam seu tratamento. Paralelamente, estudos encontrados na literatura com *Mentha* spp. e seus compostos bioativos, descrevem sua ação antifúngica. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) de compostos isolados, a ação dos compostos sobre fatores de virulência da levedura (biofilme e polimorfismo) e a ação citotóxica dos compostos sobre células HaCat. Os compostos isolados (carvona, mentona, mentofurano e pulegona), foram testados através da técnica de microdiluição em caldo de susceptibilidade a antifúngicos (CSLI, 2008), em cepas de *Candida* spp. A cepa utilizada para os testes de biofilme e polimorfismo foi a *Candida albicans* MYA-2876. Os biofilmes em formação e maduro foram pré- incubados por 2 e 24 horas respectivamente e posteriormente adicionados concentrações decrescentes dos compostos. Ambos foram mensurados após exposição de 2 horas de XTT A_{490nm}. O biofilme foi analisado através de Microscópio Eletrônico de Varredura a fim de avaliar sua estrutura após o tratamento com os compostos. O polimorfismo da levedura foi avaliado quantitativamente e qualitativamente quanto a capacidade do composto de inibir a formação de hifas através da exposição ao soro fetal bovino (SFB), com cultivo da cepa em meio líquido (análise microscópica) e sólido (análise macroscópica). A ação citotóxica dos compostos foi avaliada em células HaCat, cultivadas em meio RPMI/SFB e foram quantificadas através da adição de SRB e mensuradas a A_{530nm}. Todos os compostos inibiram o crescimento das cepas testadas, sendo a menor CIM encontrada de 0,125 mg/mL. Os compostos inibiram até 99% o biofilme em formação e desconstruiu em até 97% do biofilme maduro. Através de MEV, observou-se que o tratamento com os compostos provocou alterações do envelope celular das leveduras. As leveduras expostas aos compostos no teste de formação de hifas em meio líquido, com avaliação microscópica, mostraram diminuição de formação de hifas. Os compostos que apresentaram modificações macroscópicas na morfologia das colônias foram carvona e pulegona. A análise quantitativa de formação de tubos germinativos teve inibição de até 86%. O ensaio de citotoxicidade mostrou viabilidade celular acima de 50% após exposição aos compostos. A partir dos resultados obtidos, podemos afirmar que os compostos testados apresentam atividade antifúngica, possuem ação sobre os fatores de virulência da levedura, como formação de biofilme e polimorfismo e demonstram baixa citotoxicidade, podendo ser potenciais fontes para produção de novos produtos farmacológicos antifúngicos.

Palavras-chave: *Mentha* spp. Biofilme. *Candida* spp.

ABSTRACT

Medicinal plants has been the subject of many researchs in an attempt to discovery new drugs, as a source of potentially bioactive compounds that may act in maintaining human health. The discovery of new antimicrobial substances derived from natural products, are important in the microorganisms control, mainly due to the increase in cases of resistance to conventional antibiotics. In this sense, *Candida* species has become a problem of public health in recent decades due to increased infections named candidiasis. *Candida* spp. show virulence mechanisms, such as polymorphism and biofilm formation, which facilitates the development of infections and hinder their treatment. In parallel, studies related in the literature with *Mentha* spp. and their bioactive compounds, describe their antifungal activity. In this sense, the objective of this study was to evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC), Concentration Fungicide Minimum (MFC) of isolated compounds, their effects on yeast virulence factors (biofilm and polymorphism) and the cytotoxic action of compounds on HaCat cells. The isolated compounds (carvone, mentone, menthofuran and pulegone) were tested by microdilution method in broth susceptibility to antifungal agents (CSLI, 2008), in strains of *Candida* spp. The strain used for biofilm testing and polymorphism was *Candida albicans* MYA-2876. For tests on biofilm formation and mature biofilm, the cells were pre-incubated 2 and 24 respectively, and the added compounds. The biofilm was quantified by addition of XTT and reader at A_{490nm}. The biofilm was analyzed by scanning electron microscopy to assess the structure of the biofilm after treatment with the compounds. The polymorphism were evaluated qualitatively and quantitative as the ability of the compound to inhibit the hyphae formation through exhibition in fetal bovin serum (FBS) , with cultivation of strain in liquid medium (microscopic analysis) and solid (macroscopic analysis) medium. The cytotoxic action of the compounds was evaluated in HaCaT cells, cultured in RPMI / FBS quantified by the addition of SRB and read at A_{530nm}. All compounds inhibited the growth of the strains, the MIC was found of 0.125 mg/mL. The compounds inhibited 99% of the biofilm formation and deconstructed by up to 97% of mature biofilm. By scanning electron microscopy, it was observed that the treatment of the compounds caused cell envelope changes of yeasts. Yeasts exposed to the compounds of hyphae forming assay in liquid medium with microscopical evaluations showed decreased hyphae formation .Compounds that showed macroscopic changes in the morphology of the colonies were carvone and pulegone. The quantitative analysis of formation of germ tube inhibition was up to 86%. The cytotoxicity assay showed cell viability above 50% after exposure to compounds. From the results obtained, it can be stated that the tested compounds have a antifungal activity, acts on yeast virulence factors, such as biofilm and polymorphism, exhibit cytotoxicity low and may be potential sources for the production of new antifungal products.

Keywords: *Mentha* spp. Biofilm. *Candida* spp.

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS- Acquired Immunodeficiency Syndrome

ATCC- *The Global Bioresource Center*

CBS- *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CFM- Concentração Fungicida Mínima

CLSI- *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

DMSO- Dimetil sulfóxido

ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

GRAM- Técnica de coloração para diferenciação de microorganismos

HaCat- linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada, não transformada

HIV- *Human Immunodeficiency Virus*

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

IZ- Instituto Zimotécnico-ESALQ/USP

PBS- *Phosphate Buffered Saline*

PS- poliestireno

RPMI- Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

SAP- *Secreted Aspartyl Proteinase*

SDA- *Sabouraud Dextrose Agar*

SFB- Soro Fetal Bovino

TCA- ácido tricloroacético

SRB- Sulforrodamina B

YPD- *Yeast Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	65
ANEXO I – Composição dos meios de cultura utilizados.	65
ANEXO II- Certificado de aprovação do Comitê de Ética.	66

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas acometem centenas de pessoas no mundo, todos os anos (Brown et al., 2012). Devido ao surgimento e disseminação de microrganismos resistentes a agentes antifúngicos convencionais, o estabelecimento de infecções sem possíveis tratamentos tem afetado especialmente a população de indivíduos imunocomprometidos, se tornando um problema de saúde pública nas últimas décadas (Tsang et al., 2012; Lewis, 2013).

Tem sido observado no decorrer dos anos um aumento da ocorrência das infecções fúngicas de elevada morbidade e mortalidade. Avanços tecnológicos para o tratamento de doenças como os diversos tipos de transplantes, especialmente os de medula óssea, o advento da Aids, a quimioterapia anti-câncer e o uso difundido de antibioticoterapia de largo espectro são alguns fatores relacionados a este fenômeno, contribuindo para o aumento do número de pacientes imunossuprimidos susceptíveis a tais infecções (Jabra Rizk et al., 2004). Desde então, fungos patogênicos tem sido alvo de pesquisas visando o entendimento de seus fatores de virulência e patogenia das infecções, além da busca por tratamentos mais efetivos.

Com o uso difundido de antifúngicos, a exemplo do que ocorre com as infecções bacterianas, os fungos rapidamente tem desenvolvido resistência às drogas disponíveis, particularmente as leveduras do gênero *Candida*. Sendo assim, devido à necessidade de fontes alternativas de tratamento, plantas com potencial antimicrobiano tem sido alvo de muitas pesquisas com finalidade de se encontrar compostos efetivos, inclusive contra organismos resistentes, com baixa toxicidade para o hospedeiro.

O uso de plantas medicinais na forma de extratos, óleos ou compostos bioativos purificados, como terapia preventiva ou tratamento alternativo, tem evoluído ao longo dos anos e promovendo ações benéficas a saúde (Lorenzi & Matos, 2002). A comercialização de plantas medicinais é de fácil acesso à população e o conceito “natural” a elas atribuído, a caracterizam como produto saudável, seguro e benéfico ao ponto de vista da população. Porém, o uso indiscriminado de plantas ou seus produtos, ausentes de testes farmacológicos, pré-clínicos e clínicos podem causar danos à saúde como reações alérgicas, reações tóxicas, interações com fármacos sintéticos e efeitos sinérgicos, sendo de grande importância um estudo minucioso antes de o consumo chegar à população (Veiga Jr. et al., 2005). Dado como um

exemplo de efeitos colaterais causados pelo uso terapêutico de plantas medicinais é o óleo essencial da espécie *Mentha pulegium*. O uso oral desse óleo essencial em concentrações equivalentes a 5 gramas podem apresentar ação abortiva e hepatotóxica (Lorenzi & Matos, 2002).

Entre as plantas medicinais, destaca-se o gênero *Mentha* da família Lamiaceae atuando em importantes funções biológicas pela presença de seus compostos bioativos, que tem sido amplamente estudados por apresentarem atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica (Saharkhiz et al., 2012). Plantas desse gênero, possuem em sua parte aérea estruturas chamadas de tricomas glandulares, responsáveis pela secreção de óleo essencial com a presença de compostos bioativos (Morais, 2009).

Dentre os compostos mais comumente encontrados no óleo essencial de *Mentha* spp. estão a carvona (MKadden et al, 2009), mentona, mentofurano (Saharkhiz et al., 2012) e pulegona (Jalilzadeh et al., 2014). Estudos tem demonstrado atividade antibacteriana e antifúngica desses compostos. (MKadden et al, 2009; Saharkhiz et al., 2012; Jalilzadeh et al., 2014). Entretanto, muito ainda existe por elucidar, no que tange ao efeito antimicrobiano contra diferentes espécies de micro-organismos, aos mecanismos de ação, além da toxicidade das plantas e seus compostos biotivos, isolados ou em associação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Mentha* spp. e a possibilidade de novos medicamentos.

O gênero *Mentha* da família Lamiaceae compreende aproximadamente 30 espécies de plantas (Lorenzi & Matos, 2002), sendo algumas espécies de grande interesse econômico pela produção de metabólitos com interesse na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e medicinal (Deschamps et al., 2008; Grulova et al., 2004; Lorenzi & Matos, 2002).

Os compostos químicos encontrados no óleo essencial de *Mentha* spp. variam de acordo com idade da planta, espécie, região geográfica, clima, temperatura, disponibilidade de nutrientes, incidência de raios UV. (Deschamps et al., 2007; Lima et al., 2003). Os principais compostos identificados, presentes no óleo essencial de *Mentha* spp. são: mentol, mentona, isomentona, 1,8 cineol (eucaliptol), acetato de metila, mentil, mentofurano, limoneno, β -mirceno, β -cariofileno, pulegona e carvona (Mkaddem et al., 2009; Saharkhiz et al., 2012; Duru et al., 2004).

Como tratamento caseiro e na maioria das vezes na forma de infusões, espécies de *Mentha* são amplamente utilizadas popularmente pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas (Lorenzi & Matos, 2002). *Mentha* spp. é utilizada para tratar distúrbios digestivos, utilizada como antiespasmódico, antisséptico, antiinflamatório, entre outros (Battistin et al., 2011). Na literatura, espécies de *Mentha* também são citadas por possuírem potencial larvicida, inseticida, (Battistin et al., 2011) antibacteriano, antifúngico, antiviral, antioxidante (Saharkhiz et al., 2012; Dukic et al., 2003; İscan et al., 2002; Singh et al., 2011; Melzer et al., 2004).

Devido à disseminação de microrganismos resistentes a medicamentos convencionais (Lewis, 2013) adicionados de resultados demonstrados por estudos já realizados com algumas espécies de *Mentha* pela ação de seus compostos bioativos, pesquisas com plantas desse gênero podem trazer resultados promissores à saúde pública no desenvolvimento de novos medicamentos.

2.2 Atividade antimicrobiana de *Mentha* spp. e de seus compostos

Atualmente, plantas medicinais tem sido amplamente estudadas como alternativa de prevenção e tratamento de doenças infecciosas e não infecciosas e, a

crescente resistência de microrganismos a antibióticos tem potencializado o interesse de estudos para descobertas de novas drogas eficientes (Höfling et al., 2010).

As espécies do gênero *Mentha*, são ricas em terpenóides, uma classe de substâncias com baixo peso molecular e facilidade de penetração em células (Lorenzi & Matos, 2002). Sugere-se que, esses terpenóides sejam responsáveis pela ação antimicrobiana, interagindo com a membrana celular dos microrganismos desestabilizando-as ou modulando funções como a permeabilidade. Sendo assim, essas substâncias e o efeito biológico causado por elas, podem favorecer o rompimento do microrganismo levando-o a morte celular. (Schelz et al., 2006; Mkaddem et al., 2009; Zore et al., 2011).

A atividade antimicrobiana das espécies de *Mentha* spp. tem sido descrita em estudos por demonstrarem efetiva ação contra diversas espécies de microrganismos, como demonstra estudo realizado por Valeriano et al., (2012) contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*. Da mesma forma, diversos estudos mostram a atividade antifúngica de espécies de *Mentha* spp. *M. piperita* tem demonstrado forte atividade contra espécies de leveduras do gênero *Candida*, (Höfling et al., 2010). Dukic et al., (2003) demonstraram atividade antifúngica de espécies de *Mentha* spp. contra 6 espécies de fungos: *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. *Mentha longifolia* também apresentou ação antifúngica contra *Aspergillus ochraceus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (Mkaaddem et al., 2009).

Os compostos isolados a partir dos óleos essenciais, podem também apresentar atividade antimicrobiana. Estudo realizado com o composto pulegona presente no óleo essencial de *Mentha* spp, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica, inibindo cepas de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Arruda et al., 2006). A atividade antimicrobiana de mentofurano não é bem definida, porém, Abolfazl et al. (2014) sugere que o efeito sinérgico entre os compostos mentona, mentofurano e mentol presentes em *Mentha piperita*, promoveram a atividade antibacteriana contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhi*.

Os compostos carvona e mentona também foram citados na literatura por apresentarem atividade antifúngica e antibacteriana (Aggarwal et al., 2001; Moghtader, 2013; Mahady et al., 2005; Arruda et al., 2006). Em testes realizados com o óleo essencial de *Mentha suaveolens*, mostrou efetiva ação antimicrobiana por parte dos compostos pulegona, mentona e carvona (Oumzil et al., 2002). Hussain et al. (2010) em ensaios realizados com os compostos mentona e carvona, mostraram que os mesmos apresentaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternantia solani*, *Fusarium solani*, *Rhizopus solani* e *Rhizopus spp.*

2.3 *Candida* spp. e candidoses

Leveduras de *Candida* spp. pertencem ao Reino Funghi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Sacchamycetaceae (Guarro et al., 1999). Células de *Candida* spp. apresentam-se individualmente, de forma arredondada ou oval, medindo aproximadamente 2,0 a 6,0 μm . Como características culturais, as colônias possuem coloração branca a creme, com superfície lisa ou rugosa. Crescem em condições de aerobiose ou microaerofilia e se replicam normalmente de forma assexuada, por brotamento. (Schulze, 2009; Moreira, 2003).

Algumas espécies de *Candida* spp. residem no ser humano como organismos comensais da microbiota de grande parte da população de indivíduos sadios sem causar danos à saúde (Sardi et al., 2010; Naglik et al., 2003). Porém, são capazes de causar infecções fúngicas denominadas candidoses, frequentemente associadas a estados de imunossupressão. Alguns fatores considerados de predisposição para a doença são: idade avançada, deficiência nutricional, HIV, exposição frequente a antimicrobianos e tratamento quimioterápico. (Sardi et al., 2010; Marsh & Martin, 2005; Asmundsdottir et al., 2009; Montero et al., 2012).

Espécies de *Candida* spp. tem papel relevante no desencadeamento de infecções bucais e foram identificadas principalmente em pacientes imunocomprometidos (Miziara et al, 2004). *C. albicans* é a mais comumente encontrada na cavidade bucal, podendo causar infecções fúngicas superficiais e sistêmicas (Davey, 2006). Infecções superficiais acometem a pele e mucosa. Nas

infecções sistêmicas, o fungo pode se disseminar pela corrente sanguínea e infectar os órgãos internos (Calderone, 2002). *C. albicans* é considerada a espécie mais patogênica, porém, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* também tem se destacado em estudos, sendo de grande interesse clínico (Weems, 1992, Moreira, 2003; Santana et al., 2013; Montero et al., 2012).

Candida spp. possuem uma série de mecanismos que servem como fatores de virulência e contribuem para sua adaptação e proliferação no corpo humano e, posteriormente, o estabelecimento de infecções. Um desses fatores é a habilidade de transição morfológica pela qual a célula leveduriforme tem a capacidade de formar filamentos, chamada de polimorfismo. Essa mudança morfológica tem papel importante nos processos de infecção por *Candida* (Sudbery, 2011).

Leveduras do gênero *Candida* possuem a capacidade de se aderirem às células do hospedeiro pelo auxílio de proteínas adesinas expressas na parede celular da célula como as da família Als, Hwp1 e Eap1 (Zordan & Cormack, 2012).

Proteínas sintetizadas por *Candida* spp. como a SAP (aspartil proteinase secretada) induzem a hidrólise de ligações peptídicas das células do hospedeiro. A SAP está também associada a invasão tecidual (Barrett & Rawlings, 1991; Jacobsen et al., 2012, Coutinho, 2009; Mayer et al., 2013; Pietrella et al., 2010; Caldeirone & Fonzi, 2001).

Mecanismos de absorção de ferro também são considerados fatores de virulência pois, o ferro é um micronutriente necessário para o processo de infecção de *Candida* spp., sendo utilizado pelo microrganismo nos processos de colonização e proliferação. A adesina Als3 de *Candida* spp. possui um receptor para ferritina, auxiliando o processo de obtenção de ferro (Sutak, 2008; Almeida et al., 2008).

Um mecanismo de comunicação química celular por moléculas sinalizadoras chamado “Quorum sensing” estimulam a formação de hifas e a expressão do polimorfismo (Jacobsen et al., 2012; Santana et al., 2013). Em *C. albicans* as principais moléculas do quórum sensing são o farnesol, tirosol e o dodecanol (Berman e Sudbery, 2002).

Outro importante fator de virulência é a habilidade de formação de biofilme (Tsang et al., 2012). Espécies de *Candida* podem também ser comumente

encontradas em biofilmes. Estes biofilmes representam a redução da susceptibilidade dos microrganismos a ação da maioria dos agentes antimicrobianos, contribuindo para a permanência da infecção (Chandra et al., 2015). A formação de biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas facilitam a adesão celular, a expressão de genes de resistência a agentes antimicrobianos, promovem a formação de matriz extracelular tornando o biofilme mais resistente à penetração de agentes antimicrobianos (Tsang et al., 2012; Santana et al., 2013; Chandra et al., 2015).

Tem se observado na literatura que o aumento de candidoses vem se tornando cada vez mais frequente e de difícil tratamento devido a suscetibilidade aos antifúngicos. Diversas espécies com destaque *Candida albicans*, tem sido apontadas como relevantes patógenos em ambientes hospitalares e o insucesso na terapêutica contra esses agentes pode levar a mortalidade principalmente em pacientes imunossuprimidos. Devido a esta importância clínica, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas para o combate desses patógenos e o desenvolvimento de agentes antifúngicos que possam isoladamente ou em combinação atuarem no combate a esses microrganismos (Nunes et al., 2011; Dalazen et al., 2011).

2.4 Biofilme de *Candida* spp.

Biofilmes de *Candida* spp. são formados por comunidades de células na forma de leveduras unicelulares e filamentosas, envoltas por uma matriz extracelular que protegem as células do ambiente externo, tornando-as mais resistentes a ação de substâncias antimicrobianas. A vantagem das células estarem presentes em biofilmes, são que os mesmos podem proporcionar a essas células mecanismos que podem contribuir para a disponibilidade de nutrientes, adesão celular, cooperação metabólica e aquisição de novas características genéticas inclusive de genes de resistência a antimicrobianos (Santana et al., 2013; Douglas, 2003; Donlan, 2002).

Biofilmes podem se formar em superfícies bióticas ou abióticas (Santana et al., 2013). A literatura descreve que essas complexas comunidades microbianas já foram encontradas em dispositivos implantados como cateteres urinários, vasculares e próteses dentárias (Tsang et al., 2012; Vasconcelos et al., 2014).

Uma vez estabelecido, biofilmes de *Candida* spp. servem como reservatórios de infecções persistentes e são altamente resistentes a agentes antifúngicos em comparação a células planctônicas (Nobile & Mitchell, 2006; Chandra et al., 2001; Samaranayake et al., 2005). Estima-se que aproximadamente 80% de infecções causadas por *Candida* spp. estão associadas a presença de biofilmes (Tsang et al., 2012).

A formação de biofilmes por espécies de *Candida*, ocorrem em três fases subsequentes: a fase inicial de adesão das células fúngicas ao substrato; fase intermediária, na qual os blastóporos agregam-se e proliferam, formando uma população de células que produzirá uma matriz extracelular polissacarídica; e a fase de maturação, a qual as células fúngicas estão completamente envolvidas por esta matriz extracelular (Chandra et al., 2001).

Os componentes da matriz extracelular, se diferenciam de acordo com os microrganismos presentes (Drenkard, 2003). A matriz extracelular sintetizada no biofilme, proporciona um ambiente altamente hidratado às células de microrganismos presentes no local (Fleming et al., 2000), e, as microcolônias ficam envolvidas pela matriz e separadas por canais de água que proporcionam a circulação de nutrientes para o biofilme (Donlan & Consterton, 2002).

Durante o processo de formação do biofilme, as células se comunicam por quórum sensing, modulando o desenvolvimento e o crescimento do mesmo (Hogan, 2006). Tirosol e farnesol são moléculas sinalizadoras que foram encontradas no biofilme de *Candida* spp. A molécula tirosol promove a formação de hifa no estágio inicial de formação do biofilme, enquanto o farnesol inibe a formação de hifa para que não ocorra o crescimento excessivo do biofilme (Hogan, 2006; Hornby et al., 2001). Além disso, bactérias são frequentemente encontradas em biofilmes de *Candida* spp. indicando que os biofilmes de espécies desse gênero compartilham propriedades com biofilmes bacterianos (Douglas, 2003, Donlan et al., 2002).

2.5 Polimorfismo

Candida albicans é considerada a espécie patogênica mais frequentemente isolada em infecções fúngicas nos seres humanos, estando associada em até 50% dos casos desse tipo de infecção (Montero et al., 2012; Pemán

et al., 2012). Essa espécie possui facilidade de adaptação e proliferação em diversos ambientes do corpo humano (Tsang et al., 2012) e, essa habilidade está associada com uma importante característica de sua patogenicidade, o polimorfismo. Este, é a capacidade da levedura transformar-se em distintas morfologias, o qual a célula passa da forma unicelular podendo gerar brotos e formar filamentos chamados hifas verdadeiras (Sudbery, 2011). As transições morfológicas podem ocorrer devido a modificações ambientais como por exemplo mudança de pH e exposição ao soro sanguíneo (Gow et al., 2012; Vylcova et al., 2011; Jacobsen et al., 2012). O tubo germinativo da *Candida*, marca o começo do crescimento das suas hifas (Ellepola & Saramanayake, 2001). Entre os eventos de brotamento, formação do tubo germinativo e formação de hifas-verdadeiras, o fungo ainda pode formar pseudo-hifas. (Consolaro, 2005). As diferentes formas que o fungo pode apresentar são significativas para sua patogenicidade e estão envolvidas no seu processo de infecção (Mayer et al., 2013). A forma de levedura está relacionada a disseminação do fungo e, a forma filamentosa com a invasão tecidual (Jacobsen et al., 2012; Santana et al., 2013; Mayer et al., 2013; Hogan & Sundstron, 2009). Acredita-se que a hifa penetra no tecido através da combinação de forças físicas exercidas pela extensão de filamentos e pela secreção de enzimas aspartil proteinases que auxiliam no processo de invasão ao tecido por hidrolisar proteínas do hospedeiro, facilitando a colonização e infecção em diferentes tecidos. (Wächler et al., 2012; Naglik et al., 2004).

2.6 Resistência a antifúngicos

A resistência aos medicamentos antifúngicos vem se tornando cada vez mais um problema de saúde pública pelo aumento drástico na incidência de infecções fúngicas oportunistas e sistêmicas. Esta, é definida como persistência ou progressão de uma infecção, apesar do tratamento antimicrobiano adequado. É considerada resistência primária, quando o microrganismo é resistente ao fármaco antes da exposição, e considerada secundária quando a resistência se desenvolve em resposta a exposição do microrganismo ao fármaco (Jabra Rizk et al., 2004).

Leveduras do gênero *Candida* tem sido descritas na literatura por serem resistentes a diversas drogas antifúngicas (Jabra Rizk et al., 2004). As principais classes de antifúngicos para o tratamento de infecções por *Candida* spp. são os poliênicos (nistatina e anfotericina B), que atuam na membrana celular fúngica; azóis

(miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, cetoconazol) que atuam na enzima associada a biossíntese do ergosterol componente da membrana celular fúngica e equinocandinas (casposfungina, micafungina e anidulafungina que agem na enzima b-1,3-D-glucano sintase da parede celular fúngica (Marsh & Martin, 2005; Rodrigues et al., 2014; Maubon et al., 2014).

Apesar da ampla variedade de medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado, a literatura cita que grande parte desses medicamentos podem já não serem eficazes no combate as infecções causadas por *Candida* spp. Ramesh *et al.* (2010) mostraram em um estudo realizado com cepas de *Candida* spp. isoladas de infecções em pacientes HIV positivos que, as mesmas apresentaram resistência ao fluconazol, itraconazol e nistatina. Estudos demonstraram também resistência natural de espécies de *Candida* ao fluconazol e baixa sensibilidade de *Candida krusei* a casposfungina por *Candida parapsilosis* (Pfaller, 2012; Singh-Bahak et al., 2012). Isso se deve ao desenvolvimento de estratégias moleculares para a expressão de resistência a esses medicamentos. Entre esses mecanismos estão a inativação das drogas antimicrobianas, através de enzimas que modificam a droga tornando-a inativa ou menos ativa e modificações no alvo do antibiótico, resultando na diminuição da afinidade pelas estruturas moleculares gerando um mecanismo de resistência (Pfaller et al., 2012; González-Zorn & Escudero, 2012).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se os compostos isolados carvona, mentona, mentofurano e pulegona presentes no óleo essencial de diversas espécies de *Mentha* spp. exibem atividade antifúngica em leveduras do gênero *Candida*, bem como o efeito dessas substâncias em mecanismos de virulência como a formação de hifas e biofilme de *Candida albicans* e efeito citotóxico sobre células HaCat.

Objetivos específicos do estudo:

- a) Avaliar a atividade antifúngica dos compostos isolados (adquiridos comercialmente da empresa *Sigma Aldrich*) carvona, mentona, mentofurano e pulegona através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em *Candida* spp.;
- b) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos compostos em espécies de *Candida*;
- c) Avaliar o efeito dos compostos sobre a formação de hifas de *Candida albicans* MYA-2876 em meio líquido (análise qualitativa microscópica);
- d) Avaliar o efeito dos compostos sobre a morfologia de colônias de *Candida albicans* MYA-2876 (análise qualitativa macroscópica);
- e) Avaliar o efeito dos compostos sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 e sobre o biofilme maduro;
- f) Avaliar o efeito dos compostos sobre o biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV);
- g) Avaliar o efeito citotóxico dos compostos em células epiteliais da linhagem HaCat.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Compostos isolados

Para os ensaios, foram utilizados os compostos isolados:

- carvona (referência: 124931, lote: MKBQ5186);
- mentona (referência: 95401, lote: BCBM3599V);
- mentofurano (referência: 63661, lote: BCBN1819V);
- pulegona (referência: 55708, lote: 07013MB).

Todos os compostos utilizados foram isolados e adquiridos comercialmente da empresa *Sigma Aldrich*. Estes fazem parte da composição de óleos essenciais de *Mentha* spp.

4.2 Amostras de leveduras

Para as análises foram utilizadas cepas de diferentes espécies de *Candida* spp. descritas a seguir:

- Cepas padrão: *Candida rugosa* (IZ 12), *Candida lusitanae* (IZ 06), *Candida glabrata* (IZ 07), *Candida utilis* (CBS 5609), *Candida krusei* (CBS 573), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC MYA-2876), *Candida guilliermondii* (CBS 566), *Candida tropicalis* (CBS 74), *Candida albicans* (CBS 562), *Candida parapsilosis* (CBS 604) e *Candida dubliniensis* (CBS 7987). (CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures; IZ-Instituto Zimotécnico-ESALQ/USP ATCC-The Global Bioresource Center).

- Isolados clínicos de cavidade bucal e prótese oral: *Candida albicans* (314), *Candida albicans* (330), *Candida albicans* (335), *Candida albicans* (338), *Candida albicans* (368), *Candida albicans* (378) e *Candida albicans* (462). Os isolados clínicos são provenientes da cavidade bucal e/ou próteses dentárias de pacientes que receberam atendimento odontológico na Clínica de Prótese da Faculdade de Odontologia de Alfenas, da Universidade de Alfenas. Foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo e são mantidas no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. (Projeto

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Protocolo nº 150/15).

4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos compostos

4.3.1 Diluição dos compostos e do Fluconazol

Os compostos isolados (carvona, mentona, mentofurano e pulegona) foram diluídos em solução Tween 80 (0,05%) e meio de cultura RPMI (Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*). O antifúngico Fluconazol foi diluído em Dimetil sulfóxido (DMSO).

4.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os compostos isolados (carvona, mentona, mentofurano e pulegona) e o antifúngico comercial Fluconazol foram testados quanto a sua atividade antifúngica, sobre diferentes cepas de *Candida* spp., através de técnica de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008 - documento de padronização desenvolvido por *Clinical Laboratory Standards Institute*), em busca da CIM.

4.3.1.2 Ajuste do inóculo

As cepas foram inicialmente transferidas do estoque em glicerol e meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) mantido sob refrigeração a -20°C, para caldo YPD. Posteriormente foram incubadas em estufa de aerobiose a 37° C durante 24 horas. Após, as cepas foram transferidas para o meio de cultura SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) e incubadas em estufa de aerobiose a 37° C durante 24 horas a fim de reativar as cepas para uso.

Para o ensaio da avaliação da CIM, o inóculo foi ajustado em solução salina (0,9%), comparando-se a turbidez com a escala de *Mac Farland* (0,5), que é equivalente a uma $A_{530nm} = 0,08$ a $0,10$, ou $5,0 \times 10^6$ UFC/mL no espectrofotômetro, seguida de diluições 1:10 em solução salina (0,9%) e 1:20 em RPMI. O inóculo foi padronizado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, seguindo as recomendações do protocolo M27-A3

(CLSI, 2008 - documento de padronização desenvolvido por *Clinical Laboratory Standards Institute*).

Para os ensaios com os compostos, foram depositados em microplaca de microtitulação (estéril de poliestireno fundo “chato”) 100 µL de meio RPMI e 100 µL dos compostos isolados diluídos. Foram realizadas diluições seriadas de forma que a concentração inicial do composto fosse de 8 mg/mL e concentração final de 0,125 mg/mL na microplaca de microtitulação. Para testes com o antifúngico comercial Fluconazol foram depositados em microplaca de microtitulação (estéril de poliestireno fundo “chato”) 100 µL de meio RPMI e 100 µL do antifúngico diluído. Foram realizadas diluições seriadas de forma que a concentração inicial do Fluconazol fosse de 64 µg/mL e concentração final de 0,0625 µg/mL na microplaca de microtitulação. Posteriormente foram adicionados 100 µL do inóculo ajustado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Foram testados também grupos controles, sendo:

- Grupo de controle negativo: meio de cultura RPMI acrescido de composto ou Fluconazol;
- Grupo de controle positivo: meio de cultura e inóculo, para observação do crescimento da levedura.
- Grupo de controle do meio de cultura: somente meio de cultura com a finalidade de observar possíveis contaminações no meio.

As placas foram incubadas por 48 horas a 37° C em estufa de aerobiose, e posteriormente foi realizada leitura visual (CLSI, 2008). Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.3.2 CFM (Concentração Fungicida Mínima)

Após determinar a CIM, uma análise qualitativa foi realizada para determinar a viabilidade fúngica. Com o auxílio de palitos de madeira estéreis, uma alíquota de cada compartimento da microplaca de microtitulação do ensaio de susceptibilidade a antifúngicos foi imergido em uma placa de Petri contendo SDA. Posteriormente, as placas contendo SDA foram incubadas em estufa de aerobiose a 37° C por 48 horas. A CFM foi determinada como a menor concentração do composto que não permite o crescimento de qualquer colônia de fungos no meio sólido e após

o período de incubação, a leitura foi realizada visualmente. Foram realizados 3 experimentos independentes (Gullo *et al.*, 2012).

4.3.3 Inibição de formação de hifas em meio sólido

O efeito dos compostos foram analisados qualitativamente de acordo com o método descrito por Tsang *et al.* (2012). Foram preparados em placas de Petri meio de cultura sólido (SDA) já com os compostos diluídos na concentração sub-CIM de cada composto (carvona 1 mg/mL; mentona 4 mg/mL; mentofurano 2 mg/mL; pulegona 1 mg/mL) para a cepa *Candida albicans* MYA-2876 e suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) para a indução de formação de hifas. Posteriormente, foi transferido para a placa de SDA, 25 µL do inóculo padronizado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL da mesma forma que o ítem 4.3.1.2 porém ajustado em meio de cultura YPD caldo. Os resultados foram avaliados através da morfologia das colônias. As colônias de aspecto rugoso indicam a presença de filamentos e as colônias de aspecto liso ausência de filamentos. Foram ainda, testados grupos controles sendo:

- Grupo de controle: (SDA 10% de SFB acrescido de inóculo), para observar o aspecto das colônias com a presença de SFB sem o tratamento com os compostos e (SDA + inóculo) para observar o aspecto das colônias sem a presença de SFB.

As placas foram incubadas em estufa de aerobiose por 4 dias a 37° C e fotografadas utilizando câmera digital. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.3.4 Inibição de formação de hifas em meio líquido

O efeito dos compostos foi analisado qualitativamente de acordo com o método descrito por Tsang *et al.* (2012). Os compostos foram diluídos em meio de cultura YPD caldo suplementados com 10% de SFB (de forma que posteriormente, após a adição do inóculo, os compostos estivessem na concentração sub-CIM de cada composto (carvona 1 mg/mL; mentona 4 mg/mL; mentofurano 2 mg/mL; pulegona 1 mg/mL) para a cepa *Candida albicans* MYA-2876). Em microplaca de microtitulação foram distribuídos 100 µL do meio de cultura (já com os compostos diluídos e suplementado com 10% de SFB). Após, foi adicionado inóculo da cepa *Candida albicans* MYA-2876 padronizado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL ajustado da mesma

forma que o ítem 4.3.1.2 porém em meio de cultura YPD caldo. As células foram incubadas a 37° C sob agitação em shaker (250 rpm) por 16 horas (Inouye, 2009). Após o período de incubação, foram preparadas lâminas com o inóculo exposto ao tratamento com os compostos e sem o tratamento (controle), coradas pela técnica de GRAM, visualizadas em microscopia óptica no aumento de 40x e fotografadas com câmera digital a fim de observar qualitativamente a presença de hifas após o tratamento com os compostos comparadas ao controle. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.3.5 Inibição de tubo germinativo

O efeito dos compostos foram avaliados de forma quantitativa na inibição de formação dos tubos germinativos de acordo com o método descrito por Consolaro *et al.* (2005). Os compostos isolados foram testados nas concentrações sub-CIM de cada composto (carvona 1 mg/mL; mentona 4 mg/mL; mentofurano 2 mg/mL; pulegona 1 mg/mL) para a cepa *Candida albicans* MYA-2876. As células foram cultivadas em meio de cultura SDA por 24 horas a 37° C em estufa de aerobiose. Posteriormente, foi preparada uma suspensão celular de $2,5 \times 10^7$ UFC/mL em PBS (1x), contadas em câmara de Neubauer. Após, a suspensão celular ser padronizada, foi adicionada ao meio de cultura RPMI (com os compostos diluídos como no ítem 4.3.3.1 na concentração desejada) suplementado com SFB (1:1). A contagem de células foi realizada em microscópio óptico no aumento de 40x, nos intervalos de 2, 4 e 6 horas de incubação em estufa de aerobiose a 37° C. Os resultados para inibição de tubos germinativos foram apresentados em porcentagem. Foram realizados 3 experimentos independentes.

4.3.6 Efeito dos compostos sobre biofilme

4.3.6.1 Ajuste do inóculo

Os compostos foram testados no biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* MYA-2876. As células foram incubadas *overnight* em YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) sob agitação de 30 rpm em skaker a 30°C. Uma alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada a 10.8 G e lavada 2 vezes com PBS (1x). Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 7 mL de RPMI. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100 e as células contadas em câmara Neubauer, microscópio óptico (aumento de 40x) e o volume foi calculado a partir da contagem. A

suspensão celular final foi preparada a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, em RPMI (Pierce et al., 2008).

4.3.6.2 Efeito dos compostos sobre biofilme em formação

Em microplaca de microtitulação estéril com fundo U foram depositados 100 μ L de inóculo padronizado como no ítem 4.3.6.1. As células foram incubadas por 2 horas sob agitação de 100 rpm em shaker a 37° C. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com salina (0,9%) e adicionados 100 μ L dos compostos (diluídos como no ítem 4.3.1.1) em concentrações decrescentes sendo a concentração inicial de 16 mg/mL e final de 0,125 mg/mL. Incubou-se por 24 horas a 37° C em estufa de aerobiose. Foram preparados grupos de controle positivo (biofilme não exposto aos compostos) e controle negativo (meio de cultura) (Silva *et al.*, 2010). Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata.

4.3.6.3 Efeito dos compostos sobre biofilme maduro

Em microplaca de microtitulação estéril com fundo U foram depositados 100 μ L do inóculo padronizado como no ítem 4.3.6.1. As células foram incubadas em estufa de aerobiose a 37° C por 24 horas. Após o período de incubação foram adicionados 100 μ L dos compostos (diluídos como no ítem 4.3.1.1) em concentrações decrescentes sendo a concentração inicial de 16 mg/mL e final de 0,125 mg/mL. Incubou-se novamente nas mesmas condições. Foram preparados grupos de controle positivo (biofilme não exposto aos compostos) e controle negativo (meio de cultura). (Pierce et al., 2008). Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata.

4.3.6.4 Quantificação do biofilme

Para quantificação do biofilme foram realizadas 3 lavagens com solução salina (0,9%), para a remoção das células fracamente aderidas e coradas com 80 μ L de XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2 H -tetrazolium-5-carboxanilida] durante 2 horas. A seguir, o biofilme foi mensurado (A_{490nm}) em leitor de microplacas ELISA (Versa MAX, molecular Devices, EUA). Os valores de absorbância foram subtraídos dos valores de absorbância do controle de modo a avaliar a quantidade de biofilme (Pierce *et al.*, 2008).

4.3.7 Análise do biofilme através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Para análise do efeito dos compostos no biofilme através de MEV, o inóculo foi ajustado igualmente ao item 4.3.6.1, resultando em uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. A partir da suspensão celular final, o biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 foi produzido em lâminas de cultura (*BD Falcon*). Para o ensaio de biofilme em formação, as células foram incubadas sob agitação 100 rpm em shaker a 37° C por 2 horas e posteriormente foram adicionados os compostos na concentração de 0,5 mg/mL. Após, o biofilme foi incubado em estufa de aerobiose a 37° C por 24 horas. Para o biofilme maduro, a suspensão celular foi incubada em estufa de aerobiose a 37° C por 24 horas e após o período de incubação, foram adicionados os compostos na concentração de 0,5 mg/mL e novamente incubado por 24 horas. Após o período de incubação foi retirado o meio de cultura e o biofilme fixado com glutaraldeído (2,0%) por 30 minutos, seguido de secagem em temperatura ambiente. Os espécimes foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos. Espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para subsequente observação em MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Ao controle foram adicionadas apenas amostras de leveduras.

4.4 Avaliação citotóxica dos compostos

As células epiteliais utilizadas para este estudo provêm da linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada, mas não transformada denominada HaCat, as quais foram cultivadas na presença dos compostos para determinar se o mesmo apresenta efeito citotóxico sobre as mesmas. As células foram cultivadas em microplacas de microtitulação com meio RPMI/SFB a uma concentração celular de $6,5 \times 10^4$ UFC/mL. Posteriormente foram adicionados os compostos (diluídos como no ítem 4.3.1.1) na concentração inicial de 16 mg/mL e final de 0,125 mg/mL. Após, as células foram incubadas por mais 24 horas junto ao composto a 37° C em estufa de CO₂ (5%). Ao final de 48 horas de incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e incubadas por 1 hora a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas com água destilada, secas a temperatura ambiente e coradas com SRB sulforrodamina B (SRB) a 0,4% dissolvido em ácido acético (1%) e posteriormente lavadas 4 vezes com água destilada. Finalmente, SRB foi solubilizado com Trizma Base 10 µM. Os resultados foram mensurados (A_{530nm}) em leitor de microplacas ELISA (Versa MAX, molecular Devices, EUA) (Endo et al., 2010). Com os valores obtidos

calculou-se a média em porcentagem de viabilidade celular das concentrações testadas em relação ao controle de células (100%). A viabilidade celular foi comparada através do índice celular IC_{50%} (Índice Celular 50%) que significa a concentração do composto que induz 50% de lise ou morte celular, de acordo com Rogero et al. (2003). Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata.

4.5 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados do biofilme em formação, biofilme maduro e citotoxicidade foi utilizado teste estatístico *Dunnett* (ANOVA) pelo programa Bioestat com significância estatística $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CIM dos compostos isolados frente às células planctônicas de *Candida* spp.

Os compostos isolados foram testados sobre cepas de *Candida* spp. em busca da CIM através de técnica de microdiluição em caldo. Todos os compostos isolados testados apresentaram atividade inibitória sobre as células planctônicas de *Candida* spp., exceto mentona para *Candida tropicalis* CBS 94. Os resultados estão expressos na tabela 1.

Atividades inibitórias de até 8 mg/mL foram detectadas, porém, os compostos carvona e pulegona destacaram-se por apresentarem atividade inibitória em menores concentrações, sendo carvona para *C. utilis* CBS 5609 (0,125 mg/mL) e para os isolados clínicos *Candida albicans* 338, *Candida albicans* 368 e *Candida albicans* 378 (0,5 mg/mL); pulegona para *C. utilis* CBS 5609 (0,125 mg/mL).

Tabela 1: Resultados de leitura visual da CIM dos compostos em mg/mL.

cepas	carvona	mentona	mentofurano	pulegona
Cr IZ 12	4	8	8	1
Cl IZ 06	2	4	2	1
Cg IZ 07	4	8	8	2
Cu CBS 5609	0,125	2	1	0,125
Ck CBS 573	2	8	4	1
ATCC 90028	2	8	4	2
ATCC 2876	2	8	4	2
Cg CBS 566	1	4	4	1
Ct CBS 94	2	-	8	2
Ca CBS 562	4	8	8	2
Cp CBS 604	1	8	4	1
Cd CBS 7987	2	8	4	1
Ca 314	1	8	4	1
Ca 330	1	8	8	1
Ca 335	1	8	4	1
Ca 338	0,5	8	4	1
Ca 368	0,5	4	4	1
Ca 378	0,5	8	4	1
Ca 462	1	8	4	1

-sem atividade inibitória; Cr IZ 12: *Candida rugosa*; Cl IZ 06: *Candida lusitanae*; Cg IZ 07: *Candida glabrata*; Cu CBS 5609: *Candida utilis*; Ck CBS 573: *Candida krusei*; ATCC 90028: *Candida albicans*; ATCC 2876: *Candida albicans*; Cg CBS 566: *Candida guilliermondii*; Ct CBS 94: *Candida tropicalis*; Ca CBS 562: *Candida albicans*; Cp CBS 604: *Candida parapsilosis*; Cd CBS 7987: *Candida dubliniensis*. Isolados clínicos de *Candida albicans*: Ca 314; Ca 330; Ca 335; Ca 338; Ca 368; Ca 378; Ca 462.

5.2 CIM do antifúngico Fluconazol frente às células planctônicas de *Candida* spp.

O antifúngico Fluconazol foi testado sobre cepas de *Candida* spp. em busca da CIM através de técnica de microdiluição em caldo. Fluconazol não demonstrou atividade inibitória sobre a maior parte das cepas testadas. Os resultados podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados de leitura visual da CIM do Fluconazol em µg/mL.

cepas	Fluconazol	cepas	Fluconazol
Cr IZ 12	-	Cp CBS 604	4
Cl IZ 06	0,5	Cd CBS 7987	1
Cg IZ 07	32	Ca 314	-
Cu CBS 5609	8	Ca 330	-
Ck CBS 573	16	Ca 335	-
ATCC 90028	-	Ca 338	-
ATCC 2876	-	Ca 368	-
Cg CBS 566	1	Ca 378	-
Ct CBS 94	-	Ca 462	-
Ca CBS 562	-		

- sem atividade inibitória; Cr IZ 12: *Candida rugosa*; Cl IZ 06: *Candida lusitanae*; Cg IZ 07: *Candida glabrata*; Cu CBS 5609: *Candida utilis*; Ck CBS 573: *Candida krusei*; ATCC 90028: *Candida albicans*; ATCC 2876: *Candida albicans*; Cg CBS 566: *Candida guilliermondii*; Ct CBS 94: *Candida tropicalis*; Ca CBS 562: *Candida albicans*; Cp CBS 604: *Candida parapsilosis*; Cd CBS 7987: *Candida dubliniensis*. Isolados clínicos de *Candida albicans*: Ca 314; Ca 330; Ca 335; Ca 338; Ca 368; Ca 378; Ca 462.

5.3 CFM dos compostos isolados

Após determinar a CIM, uma alíquota do ensaio de susceptibilidade foi utilizada para determinar a CFM sobre as cepas de *Candida* spp. A menor concentração com atividade fungicida encontrada foi de 0,5 mg/mL pelos compostos carvona e pulegona, ambos sobre a cepa *Candida utilis* CBS 5609. Ainda, pulegona demonstrou atividade fungicida sobre todos os isolados clínicos na concentração de 1 mg/mL. Os resultados encontram-se expressos na tabela 3.

Tabela 3: Resultados de leitura visual da CFM dos compostos em mg/mL.

cepas	carvona	mentona	mentofurano	pulegona
Cr IZ 12	8	8	8	2
Cl IZ 06	4	4	2	2
Cg IZ 07	8	-	8	2
Cu CBS 5609	0,5	2	2	0,5
Ck CBS 573	2	8	4	1
ATCC 90028	4	8	4	4
ATCC 2876	4	8	4	2
Cg CBS 566	1	8	4	1
Ct CBS 94	4	-	8	2
Ca CBS 562	8	8	8	4
Cp CBS 604	2	-	8	2
Cd CBS 7987	4	8	8	2
Ca 314	2	8	8	1
Ca 330	2	8	8	1
Ca 335	2	8	8	1
Ca 338	1	8	8	1
Ca 368	2	8	8	1
Ca 378	2	8	8	1
Ca 462	4	8	8	1

- sem atividade fungicida; Cr IZ 12: *Candida rugosa*; Cl IZ 06: *Candida lusitanae*; Cg IZ 07: *Candida glabrata*; Cu CBS 5609: *Candida utilis*; Ck CBS 573: *Candida krusei*; ATCC 90028: *Candida albicans*; ATCC 2876: *Candida albicans*; Cg CBS 566: *Candida guilliermondii*; Ct CBS 94: *Candida tropicalis*; Ca CBS 562: *Candida albicans*; Cp CBS 604: *Candida parapsilosis*; Cd CBS 7987: *Candida dubliniensis*. Isolados clínicos de *Candida albicans*: Ca 314; Ca 330; Ca 335; Ca 338; Ca 368; Ca 378; Ca 462.

5.4 Inibição de formação de hifas em meio sólido

A formação de hifas foi induzida a partir da adição de SFB ao meio de cultura SDA e incubação a 37° C em estufa de aerobiose durante o período de 4 dias. A cepa de *Candida albicans* ATCC MYA 2874 foi exposta a concentrações sub-CIM de cada composto (carvona 1 mg/mL; mentona 4 mg/mL; mentofurano 2 mg/mL; pulegona 1 mg/mL). Foram ainda testados grupos controle 1 (contendo meio de cultura e inóculo), para avaliar a morfologia das colônias sem a presença do SFB e

grupo de controle 2 (contendo meio de cultura, SFB e cepa) para avaliar a morfologia das colônias induzidas pelo SFB sem a presença dos compostos. Após o período de incubação a morfologia das colônias foram analisadas macroscopicamente e fotografadas em câmera digital.

Observa-se que as colônias apresentaram aspecto liso após exposição ao composto isolado carvona (1 mg/mL) e colônias mistas após a exposição ao composto pulegona (1 mg/mL). Após exposição a mentona (4 mg/mL) e mentofurano (2 mg/mL) as colônias apresentaram-se com aspecto rugoso. O controle sem exposição ao SFB apresentou colônias de aspecto liso e o controle com exposição ao SFB apresentou colônias de aspecto rugoso. Os resultados estão expressos nas figuras 1 a 6.



Figura 1: Controle de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 sem SFB.



Figura 2: Controle de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com SFB.



Figura 3: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto carvona.



Figura 4: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto mentona.



Figura 5: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto mentofurano.



Figura 6: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto pulegona.

5.5 Inibição de formação de hifas em meio líquido

A formação de hifas foi induzida a partir da adição de SFB ao meio de cultura YPD e incubação a 37° C em estufa de aerobiose durante o período de 4 horas de incubação. A cepa de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foi exposta a concentrações sub-CIM de cada composto (carvona 1 mg/mL; mentona 4 mg/mL; mentofurano 2 mg/mL; pulegona 1 mg/mL). Um grupo controle contendo o inóculo, meio de cultura YPD e 10% de SFB foi testado para avaliar a presença de hifas induzidas pelo SFB sem a presença dos compostos. Após o período de incubação foram preparadas lâminas com o inóculo exposto ao tratamento dos compostos, as quais foram coradas pela técnica de GRAM e fotografadas em câmera digital a fim de observar qualitativamente a presença de hifas após o tratamento com os compostos comparadas ao controle.

Observou-se a presença de hifas após o tratamento com os compostos, porém, em menores quantidades comparadas ao controle. Carvona e pulegona (ambas na concentração de 1 mg/mL) foram os compostos que mostraram maior atividade inibitória, sendo que, as lâminas preparadas com amostras desses tratamentos demonstraram menores quantidades de hifas, enquanto as lâminas preparadas com amostras do tratamento por mentona (4 mg/mL) e mentofurano (2 mg/mL) apresentaram quantidades maiores de hifas. Os resultados podem ser observados nas figuras 7 a 11.

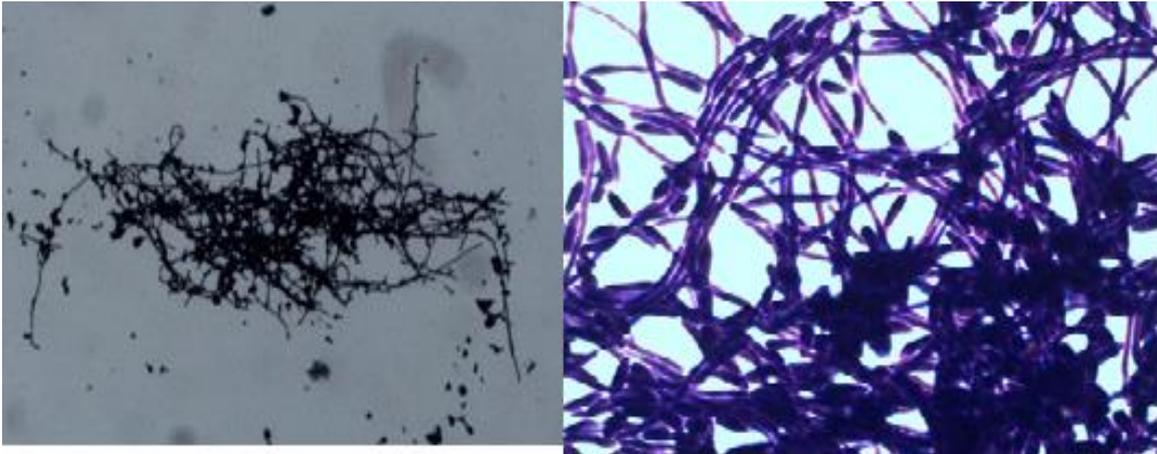


Figura 7: Controle de *Candida albicans* ATCC MYA-2876. Aumento de 10x e 40x respectivamente.



Figura 8: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto carvona. Aumento 40x.



Figura 9: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto pulegona. Aumento 40x.

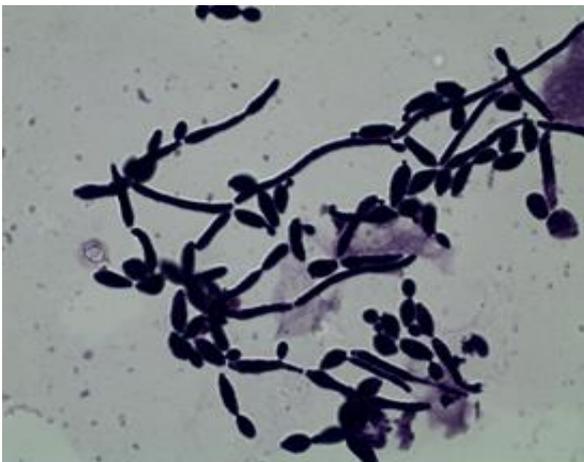


Figura 10: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto mentona. Aumento 40x.

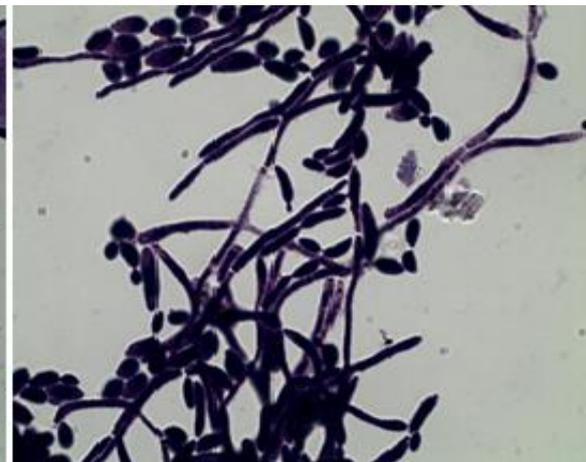


Figura 11: *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposta ao composto mentofurano. Aumento 40x.

5.6 Inibição de formação de tubo germinativo

O efeito dos compostos foi avaliado de forma quantitativa na inibição de formação de tubos germinativos da cepa *Candida albicans* ATCC MYA-2876 expostas a concentrações sub-CIM para a cepa. A contagem de células foi feita em microscópio óptico, nos intervalos de 2, 4 e 6 horas de incubação e posteriormente comparadas ao controle. Os resultados para inibição de tubos germinativos foram apresentados em porcentagem.

Carvona e pulegona se mostraram mais eficientes inibindo 72% e 79% respectivamente a formação de tubos germinativos na leitura de 2 horas, 79% e 85% na leitura de 4 horas e 79% ambos compostos na leitura de 6 horas de incubação. Todos resultados encontram-se expressos na tabela 4.

Tabela 4: Inibição da formação de tubos germinativos expressos em porcentagem

Período de incubação	carvona	mentona	mentofurano	pulegona
	1 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
2 horas	72%	65%	65%	79%
4 horas	79%	64%	69%	85%
6 horas	79%	66%	70%	86%

5.7 Efeito dos compostos sobre biofilme em formação e biofilme maduro.

Os compostos foram testados no biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 a fim de avaliar o efeito sobre o controle do biofilme em formação e destruição do biofilme maduro. Para o biofilme em formação, as células foram incubadas em microplaca de PS (*poliestireno*) de microtitulação estéril de fundo U durante 2 horas sob agitação de 30 rpm em shaker a 37° C e posteriormente foram adicionados os compostos. Para o biofilme maduro, as células foram incubadas em estufa de aerobiose durante o período de 24 horas e posteriormente adicionados os compostos.

Observou-se que os compostos inibiram até 99% a formação do biofilme comparado ao controle (expresso como 0 mg/mL) e desconstruiu em até 97% do biofilme maduro na concentração inicial testada (16mg/mL). Os resultados podem ser observados nas figuras 12 a 19.

Na análise estatística (teste de *Dunnett*- ANOVA), todos os compostos demonstraram significância ($p < 0,05$) na inibição do biofilme em formação e biofilme maduro nas concentrações testadas.

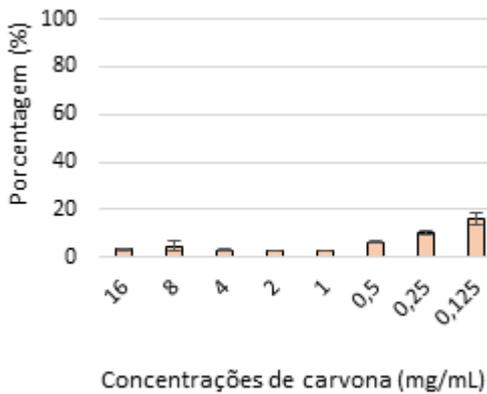


Figura 12: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto carvona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

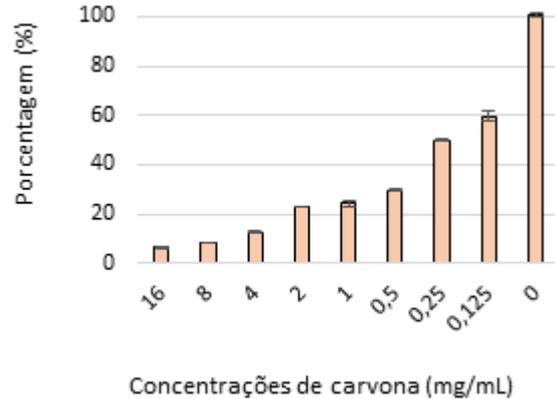


Figura 13: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto carvona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

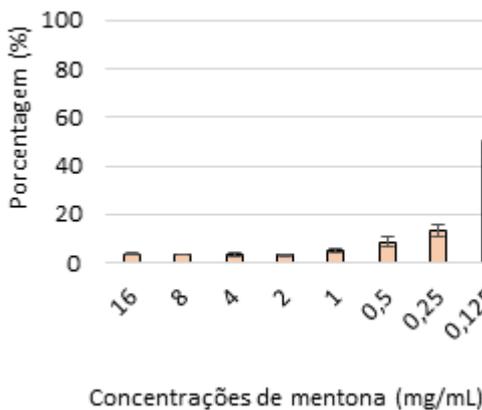


Figura 14: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto mentona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

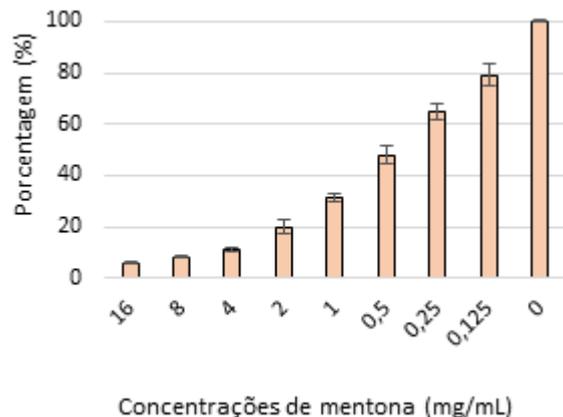


Figura 15: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto mentona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

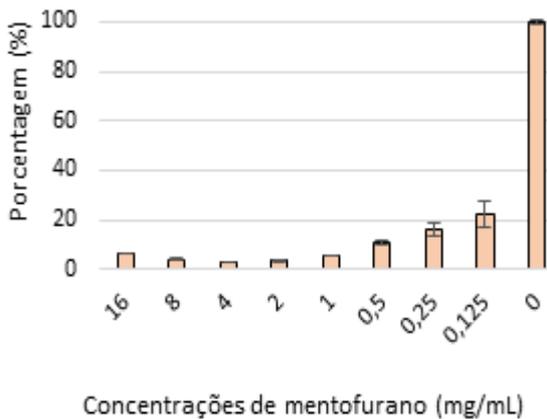


Figura 16: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto mentofurano. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA

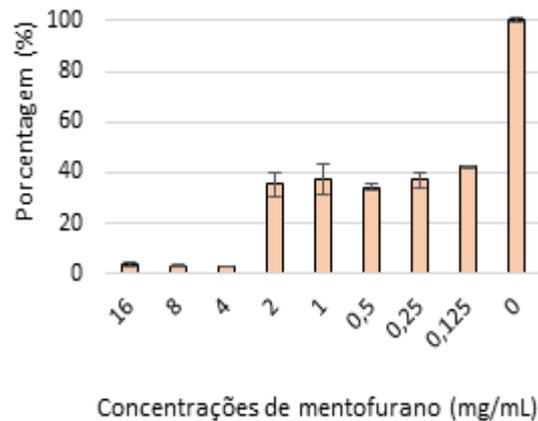


Figura 17: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto mentofurano. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA

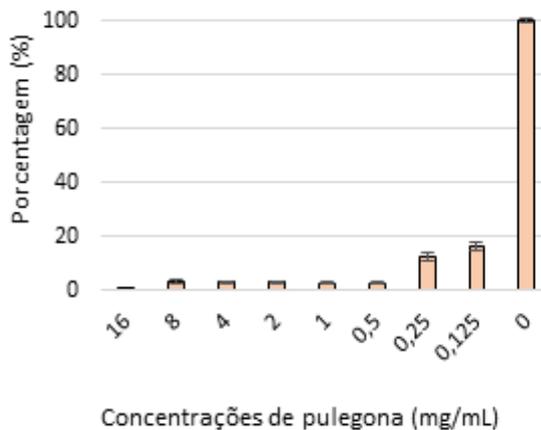


Figura 18: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto pulegona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

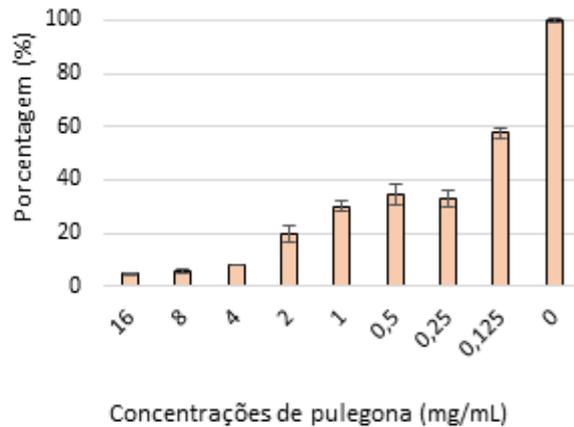


Figura 19: Gráfico representativo do crescimento (%) do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 exposto ao composto pulegona. Todos resultados mostraram significância estatística ($p < 0,05$). *Dunnett*, ANOVA.

5.8 Análise do biofilme através de MEV

O biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* MYA-2876 foi produzido em lâminas de cultura (*BD Falcon*) na concentração de 0,5 mg/mL de cada composto e posteriormente metalizado com banho de ouro a fim de avaliar o efeito

dos compostos sobre o biofilme. As imagens foram obtidas através de MEV nos aumentos de 500x e 5000x. Alterações nas células como formação de poros, rugosidades e presença de extravasamento do conteúdo celular foram observados. Os resultados estão ilustrados nas figuras 20 a 38.

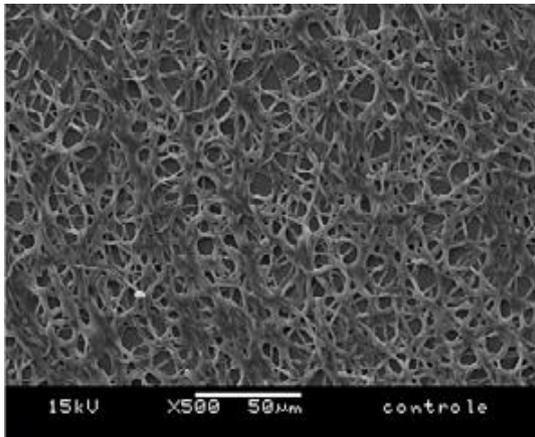


Figura 20: Controle do biofilme de *Candida albicans* MYA-2876. Aumento 500x.

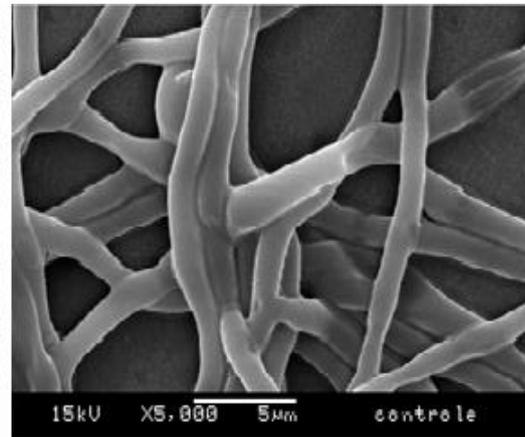


Figura 21: Controle do biofilme de *Candida albicans* MYA-2876. Aumento 5000x.

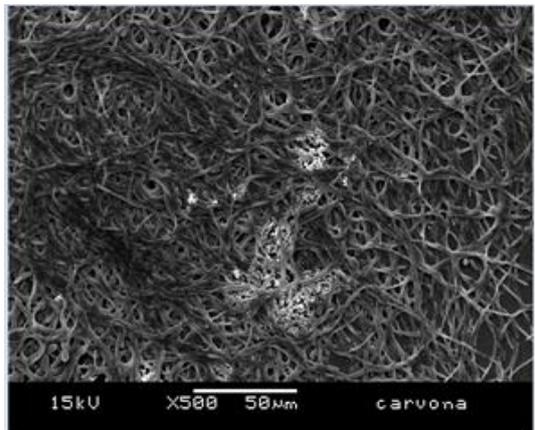


Figura 22: Biofilme em formação exposto ao composto carvona. Aumento 500x.

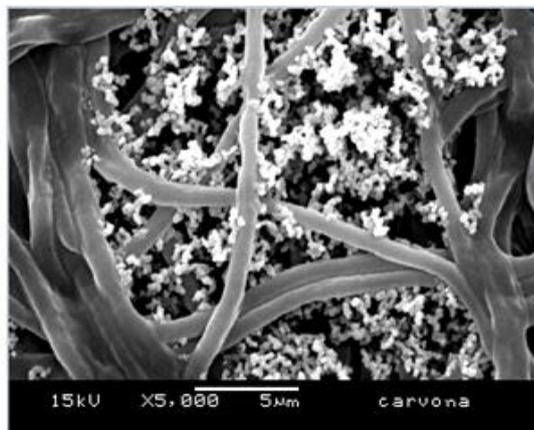


Figura 23: Biofilme em formação exposto ao composto carvona. Aumento 5000x.

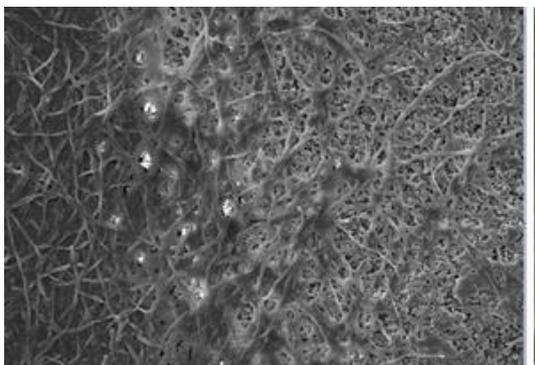


Figura 24: Biofilme maduro exposto ao composto carvona. Aumento 500x.

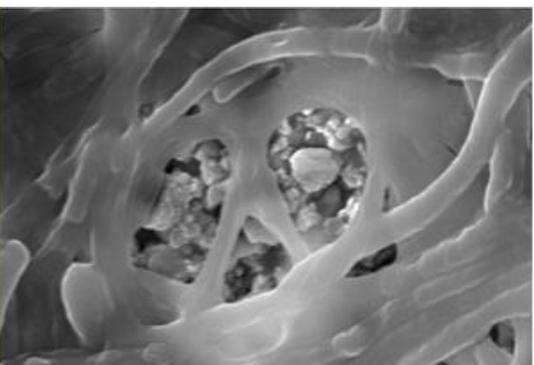


Figura 25: Biofilme maduro exposto ao composto carvona. Aumento 5000x.

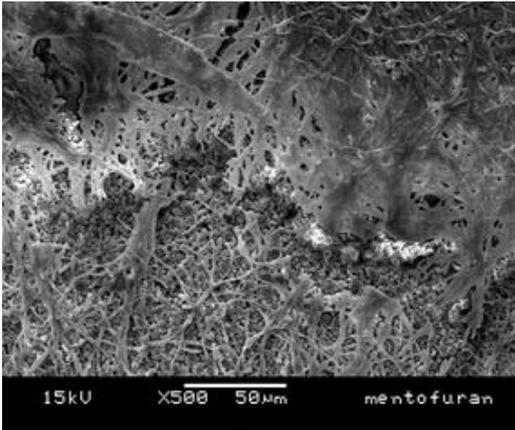


Figura 26: Biofilme em formação exposto ao composto mentofurano. Aumento 500x.

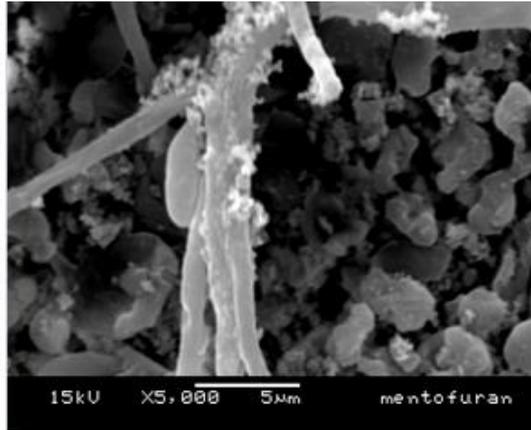


Figura 27: Biofilme em formação exposto ao composto mentofurano. Aumento 5000x.

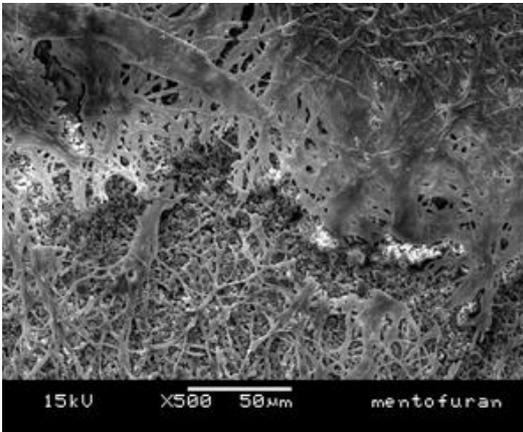


Figura 28: Biofilme maduro exposto ao composto mentofurano. Aumento 500x.

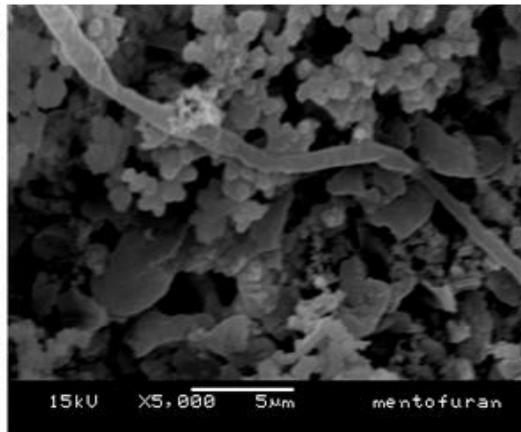


Figura 29: Biofilme maduro exposto ao composto mentofurano. Aumento 5000x.

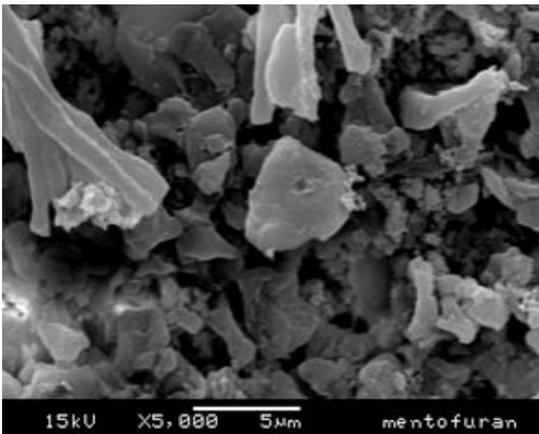


Figura 30: Biofilme maduro exposto ao composto mentofurano. Aumento 5000x.

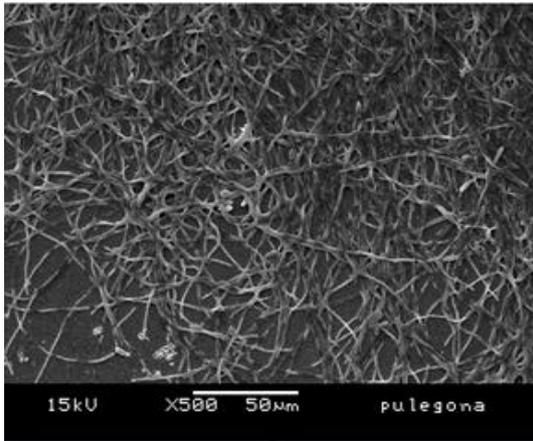


Figura 31: Biofilme em formação exposto ao composto pulegona. Aumento 500x.

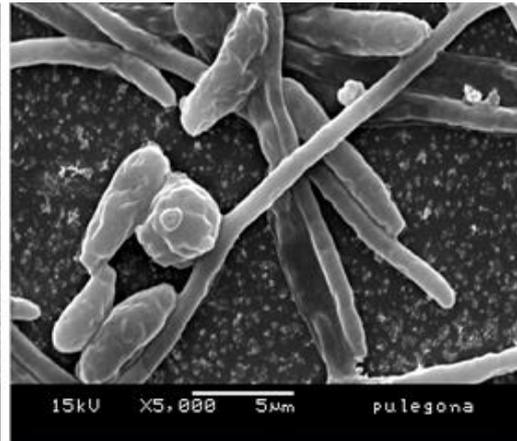


Figura 32: Biofilme em formação exposto ao composto pulegona. Aumento 5000x.

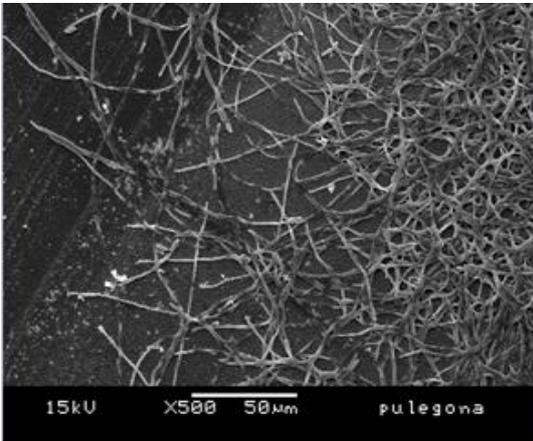


Figura 33: Biofilme maduro exposto ao composto pulegona. Aumento 500x.

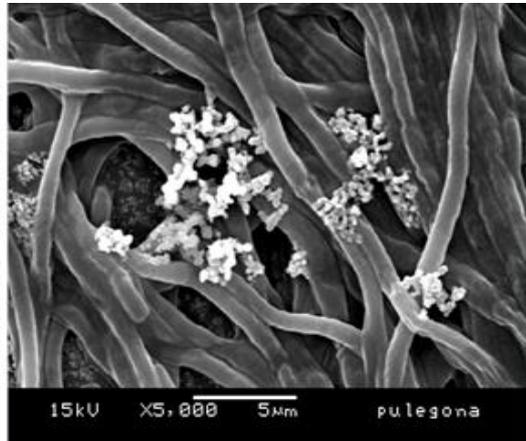


Figura 34: Biofilme maduro exposto ao composto pulegona. Aumento 5000x.

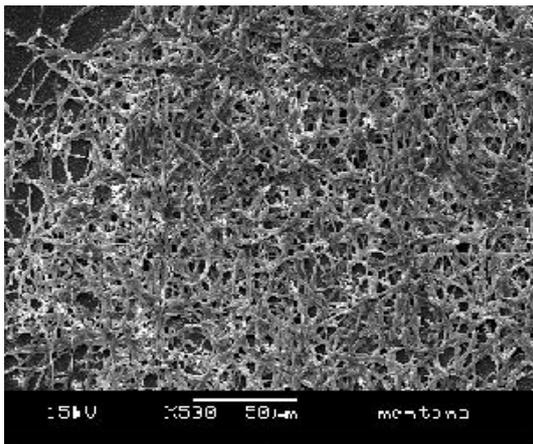


Figura 35: Biofilme em formação exposto ao composto mentona. Aumento 500x.

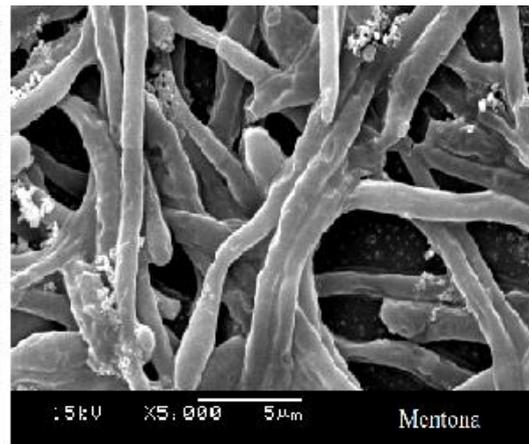


Figura 36: Biofilme em formação exposto ao composto mentona. Aumento 5000x.

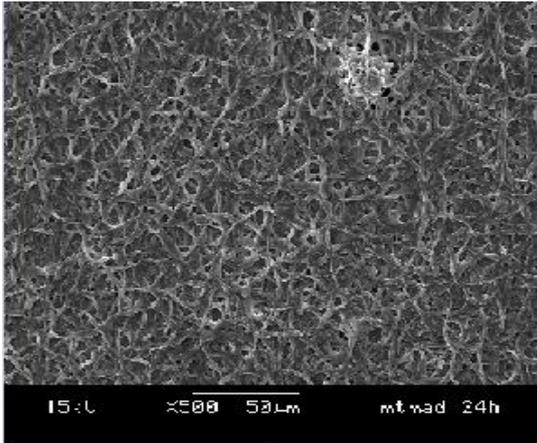


Figura 37: Biofilme maduro exposto ao composto mentona. Aumento 500x.

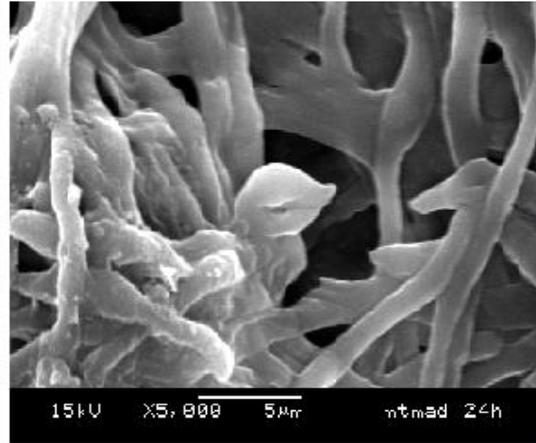


Figura 38: Biofilme maduro exposto ao composto mentona. Aumento 5000x.

5.9 Avaliação citotóxica dos compostos

Células epiteliais HaCat, foram cultivadas em placa de PS de microtitulação. Posteriormente, foram adicionados os compostos na concentração inicial de 16 mg/mL e incubadas a 37° C em estufa de CO₂ (5%) para determinar se os mesmos apresentaram efeito citotóxico sobre as células. A viabilidade celular foi comparada através do índice de citotoxicidade (IC_{50%}) que significa a concentração do composto que induz 50% de lise ou morte celular. Os resultados obtidos mostraram baixa citotoxicidade por todos os compostos testados e a viabilidade celular foi acima de 50% em todas as concentrações avaliadas comparadas ao controle.

Na análise estatística (teste de *Dunnnett*- ANOVA) foi observado que os compostos mostraram significância estatística ($p < 0,05$) apenas em algumas concentrações testadas comparadas ao controle. Os resultados encontram-se expressos nas figuras 39 a 42.

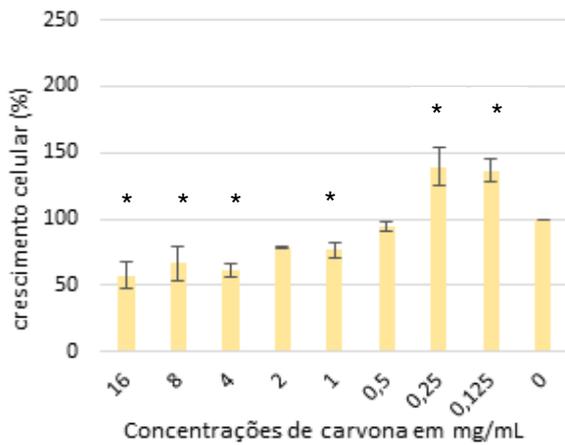


Figura 39: Gráfico representativo do crescimento (%) de células HaCat expostas ao composto carvona.

* Significância estatística ($p < 0,05$).
Dunnett, ANOVA.

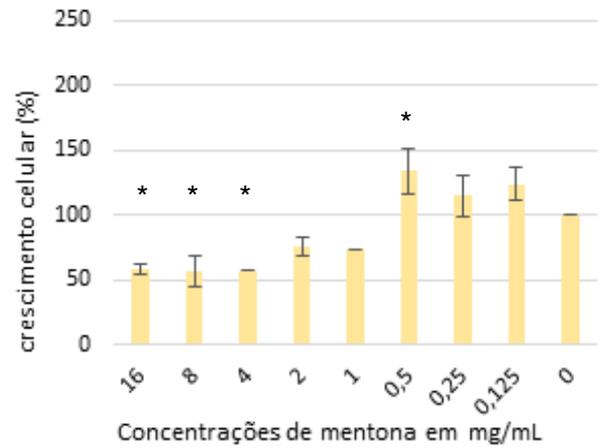


Figura 40: Gráfico representativo do crescimento (%) de células HaCat expostas ao composto mentona.

* Significância estatística ($p < 0,05$).
Dunnett, ANOVA.

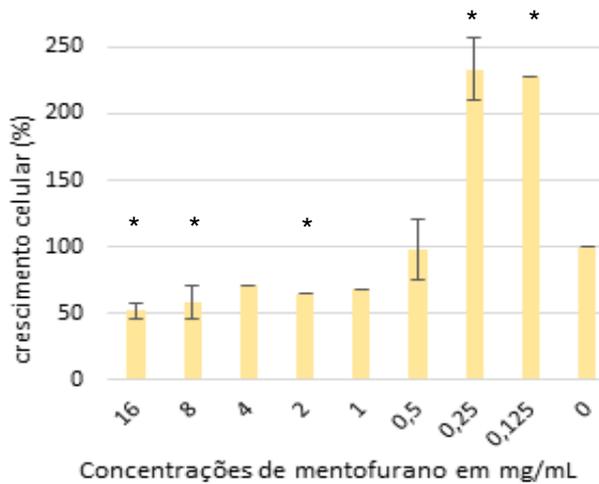


Figura 41: Gráfico representativo do crescimento (%) de células HaCat expostas ao composto Mentofurano.

* Significância estatística ($p < 0,05$).
Dunnett, ANOVA.

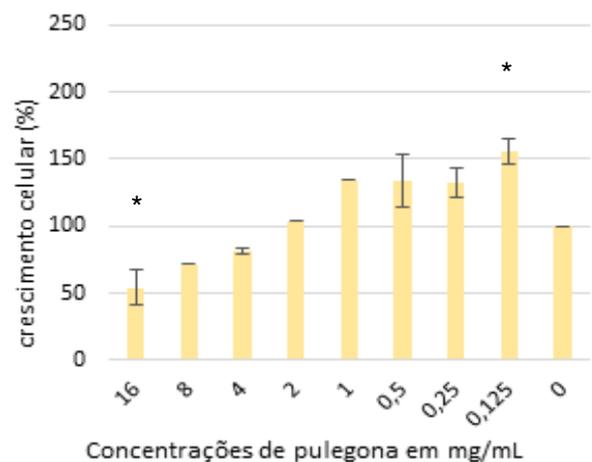


Figura 42: Gráfico representativo do crescimento (%) de células HaCat expostas ao composto pulegona.

* Significância estatística ($p < 0,05$).
Dunnett, ANOVA.

6 DISCUSSÃO

Devido ao surgimento e disseminação de microrganismos resistentes a agentes antifúngicos convencionais, (Tsang et al., 2012; Lewis, 2013) a busca por novas fontes alternativas de tratamento para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tem sido uma prioridade de muitos pesquisadores. Sendo assim, plantas com potencial antimicrobiano tem sido alvo de muitas pesquisas, incluindo o gênero *Mentha* pela presença de seus compostos com potencial bioativo (Saharkhiz et al., 2012).

No presente estudo, através do método de microdiluição (CLSI, 2008) observou-se que todos os compostos isolados de espécies de *Mentha* spp. apresentaram atividade antifúngica contra células planctônicas de *Candida* spp., sendo a concentração inicial testada de 8 mg/mL e a concentração final de 0,125 mg/mL. Para carvona, as concentrações de 2 mg/mL e 1 mg/mL foram as que inibiram a maior parte do crescimento das cepas testadas. O mesmo se verificou em relação ao mentofurano e pulegona, respectivamente na concentração de 4 mg/mL e 1 mg/mL. Mentona inibiu a maior parte das cepas com a concentração de 8 mg/mL e, não mostrou atividade inibitória sobre a cepa *Candida tropicalis* CBS 94 (Tabela 1).

Esses dados corroboram com a literatura que apontam que espécies de *Mentha* possuem atividade antimicrobiana pela presença de compostos bioativos em seu óleo essencial (Höfling et al., 2010; Dukic et al., 2003, Mkaaddem et al., 2009). Oumzil et al., (2002) sugeriu que pulegona, mentona e carvona sejam responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha suaveolens*. Da mesma forma, Hussain et al. (2010) mostraram que carvona e mentona apresentaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp. entre outras espécies de fungos e bactérias. Esses resultados, indicam que tais compostos efetivamente são farmacologicamente ativos, embora em graus diferentes.

Os testes com o antifúngico comercial Fluconazol revelaram sensibilidade para as cepas *Candida lusitanae* IZ 06 (0,5 µg/mL); *Candida glabrata* IZ 07 (32 µg/mL); *Candida utilis* CBS 5609 (8 µg/mL); *Candida Krusei* CBS 573 (16 µg/mL); *Candida guilliermondii* CBS 566 e *Candida albicans* CBS 7987 (1 µg/mL); *Candida parapsilosis* CBS 604 (4 µg/mL) (Tabela 2). Para as demais cepas testadas,

Fluconazol não apresentou atividade inibitória, demonstrando que o seu potencial antifúngico pode variar em relação às espécies quando comparadas.

Sabe-se que o Fluconazol é um dos principais antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp. (Marsh & Martin, 2005; Rodrigues et al., 2014; Maubon et al., 2014) e que apesar dos antifúngicos disponíveis para o controle desses microrganismos, *Candida* spp. tem desenvolvido estratégias moleculares para a expressão de resistência às drogas já existentes no mercado. Os resultados obtidos no presente estudo, inclusive os isolados clínicos, demonstraram que a maioria das cepas testadas não se mostraram sensíveis ao Fluconazol. Esses resultados corroboram com Ramesh et al. (2010) os quais mostraram também, que cepas de *Candida* spp. isoladas de infecções em pacientes HIV positivos apresentaram resistência ao Fluconazol, confirmando a ineficiência dessa substância a algum tempo como agente antifúngico, fato comprovado para muitos outros antimicrobianos. Nessa linha de raciocínio, os resultados obtidos através do método de microdiluição, se mostraram satisfatórios, já que os compostos isolados de *Mentha* spp. revelaram atividade antifúngica para cepas testadas as quais o antifúngico Fluconazol não apresentou, sugerindo os mesmos como possível fonte para novos medicamentos, principalmente como coadjuvantes.

De acordo com Duarte et al. (2005) com base em estudo realizado por Aligiannis et al. (2001), concentrações inibitórias mínimas de até 0,5 mg/mL são consideradas fortes, de 0,55 a 1,5 mg/mL são consideradas moderadas e acima de 1,5 mg/mL são consideradas fracas. Nesse sentido os resultados obtidos com carvona demonstraram atividade forte contra cepas de *Candida utilis* CBS 5609 e contra os isolados clínicos de *Candida albicans* 338, 368 e 378; apresentando atividade moderada para *Candida guilliermondii* CBS 566, *Candida parapsilosis* CBS 604, e para os isolados clínicos *Candida albicans* 314, 330, 335, 462; expressando atividade fraca para as demais cepas testadas. Ainda com relação a esses testes, mentona apresentou apenas atividade inibitória fraca contra as cepas testadas e mentofurano revelou atividade moderada contra *Candida utilis* CBS 5609 e atividade fraca para as demais cepas.

Da mesma forma, o composto pulegona apresentou atividade forte para as cepas *Candida utilis* CBS 5609, moderada para as cepas *Candida rugosa* IZ 12, *Candida lusitanae* IZ 06, *Candida krusei* CBS 573, *Candida guilliermondii* CBS 566,

Candida parapsilosis CBS 604, *Candida dubliniensis* CBS 7987 e para todas as cepas clínicas, e atividade fraca para as demais cepas testadas. Esses dados demonstram que o perfil de atividade antifúngica dessas substâncias atua de forma diversa em relação às cepas de *Candida*, conforme já demonstramos anteriormente, o que sugere que o potencial de ação das mesmas é relativo, o que deve-se levar em conta.

Rios et al., (1988), ressalta que para que o uso do óleo essencial ou extratos de plantas sejam ideais para aplicação clínica, possuam ação até 100 µg/mL do princípio ativo, pois, a maioria dos antifúngicos utilizados clinicamente possui concentração ativa em torno de 10 µg/mL. Sendo assim, com base nos resultados aqui expressos, sugerem-se estudos para avaliar o potencial antifúngico dos compostos se utilizados em concentrações menores porém em uso combinado com outros agentes antifúngicos (sinergismo).

A CFM dos compostos também foi avaliada sobre as cepas de *Candida* spp. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3), os compostos que se destacaram pela atividade fungicida em menores concentrações foram carvona sobre as cepas *Candida utilis* CBS 5609 (0,5 mg/mL) e *Candida guilliermondii* CBS 566 (1 mg/mL); pulegona sobre as cepas *Candida utilis* CBS 5609 (0,5 mg/mL), *Candida krusei* CBS 573, *Candida guilliermondii* CBS 566 e todas as cepas clínicas (1 mg/mL). Tendo em vista o que foi ressaltado por Rios et al., (1988) que as concentrações ideais de óleo essencial ou extratos de plantas para aplicação clínica sejam de até 100 µg/mL, estes resultados sugerem que essas concentrações se apresentam mais adequadas para a aplicação clínica dessas substâncias potencialmente farmacologicamente ativas.

Normalmente, observa-se resistência de espécies de *Candida* provenientes de isolados clínicos (principalmente aquelas que infectam pacientes HIV positivos), aos medicamentos convencionais (Rex et al., 2000). Apesar dos isolados clínicos terem perfil de resistência mais alto, alguns compostos mostraram resultados semelhantes de atividade fungicida em relação as cepas padrões. Foi observado também em alguns resultados que as concentrações que mostraram atividade sobre as cepas clínicas foram menores que as concentrações que tiveram atividade sobre as cepas padrões, como pode ser observado pelo composto pulegona, o qual apresentou atividade fungicida sobre todas as cepas clínicas na concentração de 1 mg/mL enquanto que para as cepas padrões na concentração de até 4 mg/mL. Esses

dados são sugestivos de aplicação terapêutica sobre isolados clínicos, motivos de preocupação dos estudos que levam em conta a procura de substâncias com potencial antimicrobiano alternativo. As diferenças entre o potencial de ação sobre as cepas padrões e clínicas, dependem de muitos fatores e devem merecer uma atenção maior em pesquisas futuras.

A formação de hifas é um mecanismo de virulência encontrada em *C. albicans*. Essa espécie é considerada um fungo polimórfico, por ter a capacidade de se diferenciar morfológicamente de levedura unicelular e com formato arredondado para hifas (Sudbery, 2011; Kayser, 2005). Essas variações morfológicas podem ocorrer devido a variações ambientais como modificação do pH e exposição ao soro sanguíneo. (Gow et al., 2012; Vylcova et al., 2011; Jacobsen et al., 2012). A capacidade de transição morfológica de *Candida albicans* é um fator preocupante no ponto de vista médico por permitir invasão tecidual e agravamento de doenças como a candidose em pacientes imunossuprimidos e candidemia, já que tanto a forma de hifa como a forma de levedura são importantes para o estabelecimento do fungo, uma vez que a hifa está relacionada com a invasão tecidual e a célula leveduriforme está associada a disseminação do fungo (Jacobsen et al., 2012; Santana et al., 2013; Mayer et al., 2013).

Em nossa pesquisa foi avaliada a capacidade do fungo promover transição morfológica de forma qualitativa e quantitativa na presença de compostos isolados (carvona, mentona, mentofurano e pulegona), através da exposição do microrganismo ao SFB. Foi observado que todos os compostos exibiram a capacidade de inibir a formação de hifas em todos os testes de forma satisfatória, com reduções que variaram de 65% a 86% no teste quantitativo de inibição de tubos germinativos.

Os compostos que exibiram maior atividade nos testes realizados foram carvona e pulegona, os quais apresentaram melhor atividade inibitória de crescimento nos ensaios de susceptibilidade a antifúngicos. Esses compostos foram os únicos que apresentaram mudanças na morfologia macroscópica de colônias cultivadas na presença dos compostos, para o teste qualitativo. Além disso, apresentaram maior atividade de redução na transição morfológica de levedura para hifa e levedura para pseudo-hifa nos ensaios em meio líquido qualitativo.

Segundo Raut et al. (2013), alguns terpenóides inibem a formação de hifas, e, por exibirem capacidade de danificar a membrana celular, podem ser utilizados no

controle desse fator de virulência, evitando que o fungo promova invasão tecidual. Nossos dados corroboram com Samber et al. (2014), que observaram redução de formação de hifas pelo óleo essencial de *Mentha piperita* e por compostos isolados, como, mentona e carvona. Os dados obtidos demonstraram que não somente o óleo essencial de *Mentha* spp., mas também compostos isolados podem promover uma diminuição da expressão de fatores de virulência, como formação de hifas.

Os biofilmes são considerados comunidades complexas de microrganismos em associação envoltas por uma matriz extracelular. Esse arranjo favorece a sobrevivência dos microrganismos presentes nesse ambiente. Os integrantes do biofilme podem ser de uma única espécie ou multi-espécies e estão associados à resistência contra o sistema imunológico do hospedeiro e resistência a drogas comerciais antimicrobianas, já que a penetração nessa estrutura é dificultada devido ao arranjo celular e a matriz extracelular encontrada no biofilme, formando uma barreira física que impede que células do sistema imune e drogas cheguem até os microrganismos presentes no biofilme. (Ramage et al., 2005; Uppuluri et al., 2009).

Candida albicans é um dos fungos clínicos mais relatados em associação ao biofilme em pacientes imunossuprimidos (Kunamoto, 2002; Ramage et al., 2005) e o arranjo de biofilmes de *C. albicans* são formados por dois tipos de células: células leveduriformes e células filamentosas (chamadas de hifas e pseudo-hifas). No desenvolvimento de biofilmes *in vitro*, acredita-se que a ordem de acontecimentos inicie com a adesão de células de levedura em substrato, proliferação celular e formação de projeções filamentosas (hifas e pseudo-hifas) que se intercalam e acúmulo de matriz extracelular (Jonathan & Mitchell, 2011). Portanto, as hifas não são somente importantes para mecanismos de invasão tecidual, mas também são importantes no desenvolvimento de estruturas complexas como o biofilme.

O biofilme de *Candida* spp. tem sido associado a infecções clínicas (Davey et al., 2002) e estão associados com aderência em dispositivos médicos, como cateteres, sondas e próteses, aumentando os índices de infecções fúngicas hospitalares (Costerton et al., 1984; Dougherty et al., 1988; Uppuluri et al., 2009). Sendo assim, o controle e destruição do biofilme em *Candida* spp. é considerado um desafio no ponto de vista clínico, pois pode dificultar o tratamento e recuperação dos pacientes (Chandra et al., 2015).

O presente trabalho também avaliou a ação de compostos isolados de *Mentha* spp. no biofilme em formação e biofilme maduro de *Candida albicans* MYA-2876, com o objetivo de saber se os compostos isolados também agiam sobre esse outro fator de virulência.

Todos os compostos testados (carvona, mentona, mentofurano e pulegona) se mostraram eficientes contra o biofilme em formação de *Candida albicans* MYA-2876, impedindo em aproximadamente 50% a aderência e progressão do biofilme em baixas concentrações de composto (0,125 mg/mL para carvona, pulegona e 0,5 mg/mL para mentofurano e mentona). Na concentração inicial testada (16 mg/mL) carvona e mentona inibiram em aproximadamente 96%, mentofurano em 93% e pulegona 99% a formação do mesmo se comparado ao controle. Esses dados mostram o potencial preventivo do desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*, como pode ser observado por Peixoto, 2010 (dados não publicados) que demonstrou que frações (F2 e F3) de *Mentha* spp. apresentaram efeito inibitório sobre biofilme em formação.

Os resultados encontrados para o biofilme maduro mostram que todos os compostos foram capazes de desconstruir essa estrutura em aproximadamente 50% em baixas concentrações (menor ou igual a 0,5 mg/mL). Na concentração inicial testada (16 mg/mL), o biofilme foi desconstruído em 94% por carvona e mentona e 97% por mentofurano e pulegona.

Como já discutido anteriormente, o biofilme por ter uma estrutura complexa, fornece aos seus integrantes uma proteção devido à baixa penetração de drogas em seu interior, dificultando a destruição do mesmo. Os resultados obtidos com os compostos testados mostraram resultados satisfatórios de desconstrução do biofilme formado, possibilitando seu uso como forma terapêutica. Outro ponto interessante são as baixas concentrações necessárias para a desconstrução do biofilme, sendo que esse fato pode ter relação com a natureza dos compostos (terpenóides) que possuem baixo peso molecular e facilidade de penetração nas células (Lorenzi & Matos, 2002; Schelz et al., 2006; Mkaddem et al., 2009; Zore et al., 2011).

A ação de óleos essenciais de *Mentha* spp. ou compostos isolados contra biofilme de *Candida albicans* e outros microrganismos já foi encontrada na literatura (Agarwal et al., 2008; Filoche et al., 2005). Peixoto (2010) (dados ainda não publicados), mostrou em seu estudo que frações (frações F2 e F3) do óleo essencial

provenientes de *Mentha* spp. obtidas através de técnica de separação cromatográfica, apresentaram atividade inibitória sobre estas duas formas de biofilme. Esses resultados demonstram que os compostos isolados, ou frações se mostram eficazes contra esse fator de virulência.

Com o objetivo de investigar a estrutura do biofilme após o tratamento com os compostos vegetais isolados, as amostras de biofilme foram analisadas visualmente através de MEV na concentração de 0,5 mg/mL, a qual teve atividade de até 50% de inibição de formação do biofilme e desconstrução do biofilme maduro. As imagens evidenciaram poros e rugosidades no envelope celular de *Candida albicans* MYA-2876 e também extravasamento de conteúdo celular. Esse episódio também foi observado em estudo realizado por Pereira (2005) com óleos essenciais sobre espécies de fungos que acometem plantas.

Marcos Arias et al. (2011) relataram que as propriedades antifúngicas de óleos essenciais estão relacionadas com a capacidade de terpenos de penetrarem a parede celular fúngica e localizar cadeias de ácidos graxos da bicamada lipídica, rompendo-a, alterando assim sua estrutura. Braga et al. (2007) demonstraram também, através de MEV, que timol, composto terpênico, afetou o envelope de leveduras de *C. albicans*. Foram encontradas alterações na membrana celular, extravasamento do conteúdo celular e lise das células, confirmando essas alterações.

Visto que a literatura tem demonstrado resultados satisfatórios do potencial antimicrobiano das plantas e seus compostos bioativos (Valeriano et al., 2012; Höfling et al., 2010; Duckic et al., 2013), as mesmas tem se tornado como possível alternativa ao uso de medicamentos. A comercialização de plantas medicinais é de fácil acesso à população e o conceito “natural” a elas atribuído, podem sugerir as mesmas como produtos saudáveis, seguros e benéficos. No entanto, o uso indiscriminado de plantas ausentes de testes toxicológicos podem causar danos à saúde, sendo de grande importância um estudo minucioso antes de o consumo chegar à população (Veiga et al., 2005). É conhecido que compostos bioativos isolados de plantas são quase sempre tóxicos em altas concentrações (Lhullier et al., 2006), por essa razão, foi avaliada a citotoxicidade dos compostos do presente trabalho.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células HaCaT, células de queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente. Essa linhagem celular

têm sido amplamente utilizada como um modelo de exposição a células epiteliais (Shigeri et al. 2006).

Os cálculos de viabilidade celular foram realizados a partir da densidade óptica (DO) comparadas ao grupo controle (sem tratamento com o composto). A porcentagem de crescimento foi realizada através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), um corante que é capaz de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), permitindo uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. (Skehan et al., 1990).

Sharma et al. (2014), relataram atividade antiproliferativa em células das linhagens HCT-116 e PC-3, sugerindo que o óleo essencial de *Mentha* spp. pode conter determinados constituintes citotóxicos que podem ser os responsáveis por tal atividade. Segundo Patel & Takkar (2014), carvona apresentou atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de MCF 7. Porém, no presente estudo, os compostos testados mostraram baixa toxicidade nas concentrações avaliadas e a viabilidade celular ficou acima da linha correspondente a 50% de crescimento celular de acordo com o IC_{50%} (Índice Celular 50%), que expressa a concentração do composto que provoca lise ou morte de 50% da população celular (ISO, 1992). Esses dados corroboram com estudos anteriores com outras linhagens celulares em nosso laboratório, os quais compostos isolados de *Mentha* spp. não apresentaram atividade antiproliferativa, como relata Peixoto, 2010 (dados não publicados), que testou 2 frações de óleo essencial de *Mentha* spp. e as mesmas não interferiram no metabolismo de células epiteliais renais (VERO).

Nossos dados de atividade antiproliferativa se mostram importantes, já que segundo *National Institute of Health* (1996) (NIH), dados *in vitro* podem ser úteis na estimativa das doses iniciais para os testes *in vivo* de toxicidade aguda, que irão reduzir o número de animais necessários para tais determinações.

O fato dos ensaios de citotoxicidade terem mostrado que os compostos nas concentrações testadas estão nos valores permitidos pelo índice de mortalidade celular (IC_{50%}), e com os resultados obtidos nos ensaios anti-*Candida*, os mesmos se mostram como potencial de segurança para serem utilizados como agentes antifúngicos.

6 CONCLUSÃO

1. Os compostos isolados do óleo essencial de *Mentha* spp. se mostram biologicamente ativos contra espécies de *Candida* spp.
2. O antifúngico comercial Fluconazol não apresentou atividade inibitória sobre a maioria das cepas testadas.
3. Todos os compostos testados apresentam atividade fungicida (CFM). Os compostos mentona e pulegona exibem CFM igual a CIM para a maior parte das cepas, já carvona e mentofurano exibem CFM em uma concentração acima do CIM.
4. Os compostos isolados revelam atividade de inibição de hifas nos ensaios qualitativos microscópicos, e quantitativo de inibição de tubo germinativo, porém, somente carvona e pulegona demonstram atividade no ensaio qualitativo de alterações morfológicas macroscópicas.
5. Os compostos do óleo essencial de *Mentha* spp. revelam capacidade de inibição do biofilme em formação e destruição do biofilme maduro. Observações em MEV revelam que *Candida albicans* MYA-2876 quando expostas aos compostos apresentam poros e rugosidades, além de extravasamento celular.
6. Os compostos isolados apresentam baixa citotoxicidade em células epiteliais HaCat nas concentrações testadas.

REFERÊNCIAS

Abolfazl M; Hadi A; Frhad M; Hossein N. In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2014. Vol. 8(3): 186-194.

Aggarwal KK, Khanuja SPS, Ahmad A, Santha Kumar TR, Gupta VK, Kumar S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Fragr J.* 2002; 17(1):59–63.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 2001; (49): 811-815.

Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE et al. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* 2008; (4): 11

Arruda AT; Rossana M.P; Antunes RMP; Catão RMR; Lima EO; Sousa DP et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2006. 16(3): 307-311.

Asmundsdóttir LR, Erlendsdóttir H, Agnarsson BA, Gottfredsson M. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clinical microbiology and infection.* 2009; 15 (6): 576–85.

Battistin A, Fermino MH, Silveira JRP, Gonçalves RS, Pasquetti MV, Santos AE, et al. Espécies de *Mentha* com propriedades medicinais, aromáticas e condimentares. Circular técnica. Porto Alegre: FEPAGRE; 2011.

Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genetic.* 2002; (3): 918-30.

Braga PC, Alfieri M, Culici M, Dal Sasso M. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. *Mycoses.* 2007 Nov; 50(6):502–6.

Brown AJ. Morphogenetic signaling pathways in *Candida albicans*. In: Calderone R. *Candida and candidiasis*. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 95-106.

Calderone RA. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, American Society for Microbiology. Washington DC; 2002.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(7):327-35.

Chandra J; Kuhn DM; Mukherjee PK; Hoyer LL; McCormick T; Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 2001: 183(18).

Chandra J; Mukherjee PK; Leidich SD; Faddoul FF; Hoyer LL; Douglas LJ; Ghannoum MA. Antifungal Resistance of Candidal Biofilms Formed on Denture Acrylic in vitro. *J. Dent. Res.*, 2001: 80(3).

Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: Development, architecture and resistance. *Microbiol Spectrum*. 2015: 3(4).

CLSI (2008). Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica. Clinical and laboratorial standards institute. CLSI Norma M27-A3, v.28, n.14, 2 ed., 2008.

Consolaro MEL; Albertoni TA; Svidzinski AE; Peralta RM; Svidzinski TIE. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 2005; 159: 501–507.

Costerton JW, Lashen ES. Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causes bacteria. *Mater Perform* 1984; 23:13-7.

Coutinho HDM. Factors influencing the virulence of *Candida* spp. *West Indian Med J*. 2009 Mar;58(2):160–3.

Davey ME and GA O'Toole. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 64:847-67.

Davey ME, Costerton JW. Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates. *Periodontol.* 2006; (42): 13-26.

Dazalen D, Zanrosso D, Wanderley L, Silva NL, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. Oraís e vulvovaginites do sul do Brasil. *Bras Patol Med Lab.* 2011; 47(1): 33-38.

Deschamps C, Zanatta JL, Bizzo HR, Oliveira M de C, Roswalka LC. Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. *Ciênc e Agrotecnologia.* 2008 Jun;32(3):725–30.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-93.

Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; (11): 30-6.

Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003; (5): 1213-19.

Dukić NM, Bozin B, Soković M, Matavuklj M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Med.* 2003 May; 69(5):413– 9.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005 Fevereiro; 97(2):305– 11.

Duru ME, Oztürk M, Uğur A, Ceylan O. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94(1): 43-8.

Ellepola ANB, Samaranayake, LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Diseases.* 2001; 7: 11-17.

Endo EH; Cortez DAG; Ueda-Nakamura T; Nakamura CV; Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and purê compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Elsevier,* 2010; 161: 534-540.

Filoche SK, Soma K, Sissons CH. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. 2005; 20: 221-225.

Flemming HC, Wingender J, Mayer C, Korstgens V, Borchard W. Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M editores. Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 87-105.

González-Zorn B, Escudero JA. Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment. Int Microbiol. 2012; 15(3): 101-9.

Gow NA, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. Current Opinion in Microbiol. 2012; 15(4): 406-12.

Gullo FP; Sardi JCO; Santos VAFFM; Sangalli-Leite F; Pitangui NS; Rossi AS et al. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. Hindawi Publishing Corporation, 2012. doi:10.1155/2012/340787.

Grulova D, De Martino L, Mancini E, Salamon I, De Feo V. Seasonal variability of the main components in essential oil of *Mentha × piperita* L. J Sci Food Agric. 2015;95(3):621–7.

Guarro J, Gene J, Stchigel A M. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev 1999;12(3): 454-500.

Höfling JF, Anibal PC, Obando-Pereda GA, Peixoto IAT, Furletti VF, Foglio MA et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. Bas J Biol. 2010; 70(4): 1065-9.

Hogan DA, Sundstron P. The Ras/cAMP/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*. Future Microbiol 2009; 4 (10): 1263-1270.

Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. Eukaryot Cell. 2006; 5(4), 613-19.

Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(7): 2982-92.

Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani A. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric*. 2010; 90: 1827-1836.

ISO document 10993-1, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests. 2. ISO document 10993-5, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

Iscan G, Kirimer N, kurkcuoglu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 3943-46.

Jabra-Rizk MA; Falkler WA; Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(1).

Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, Brunke S, Naglik JR, Hube B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012 Jan;10(1):85–93.

Jalilzadeh A; Maham M. Antidiarrheal activity and acute oral toxicity of *Mentha longifolia* L. essential oil. *Avicenna J Phytomed*, 2015; 5 (2): 128-137.

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J. *Medical Microbiology*. Thieme; 2011. 732 p.

Kunamoto CA. *Candida* Biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 608-611, 2002. Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol*. 2003; 49:353–62.

Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Ver Drug Discov*. 2013; 12(5).

Lima MRF, Ximenes ECPA, Luna JS, Sant'Ana AEG. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras of Pharmacog*. 2006; 16(3): 300-06.

Lorenzi H, Mattos FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil - Nativas e Exóticas*. 2a ed. Plantarum; 2002.

Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16: 158-163.

Mahady GB, Pendland SL, Stoia A et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytoter Res 2005; 19: 988-91.

Marsh P, Martin M V. Microbiologia oral. 4º ed. Santos: São Paulo-SP, 2005

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119–28.

Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? Intensive Care Med. 2014 Sep; 40(9):1241–55.

Melzer J, Rosch W, Reichling J, Brigmoli R, Saller R. Meta-analysis: phytotherapy of functional dyspepsia with the herbal drug preparation STW 5 (Iberogast). Aliment Pharmacol Ther. 2004; 20:1270-87.

Miziara ID; Lima AS; Cortina RAC. Candidíase oral e leucopsia pilosa como marcadores de progressão da infecção pelo HIV em pacientes brasileiros. Rev. Bras. Otorrinolaringol., 2004. 70(3): 310-14.

Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. J Food Sci. 2009 Sep; 74(7):M358–63.

Moghtader M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. Afr J Plant Sci, 2013; 7(11):521-527.

Montero JG, Martín AD, Piappón MRP de, Cabrera EG. Infección fúngica invasiva em los pacientes ingresados em las áreas de críticos. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012; 30(6):338-343

Morais LAS. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. Horticultura Brasileira. 2009; 27:050-063.

National Institute Of Health. Health Effects Acute Dermal Toxicity. Test Guidelines OPPTS 870.1200, 1996.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003; 67(3): 400-28.

Nobile CJ; Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cellular microbiology*, 2006;8(9): 1382-1391.

Nunes, EB, Monteiro JCMS, Nunes NB, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da região norte do Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. 2011; 2(4): 23-30.

Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani, faid m, Benjouad A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytoterapy Research* 2002; 16: 727-31.

Patel PB, Thakkar VR. L-carvone induces p53, caspase 3 mediated apoptosis and inhibits the migration of breast cancer cell lines. *Nutr Cancer*. 2014;66(3):453-62.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494-500.

Pemán J, Zaragoza R. Hacia el diagnóstico temprano de la candidiasis invasora em el paciente crítico. *Ver Iberoam Micol*. 2012; 29(2):71-75.

Peixoto ITA, Hofling JF. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes acessos de *Mentha* spp. contra *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Dissertação de doutorado. 2010, FOP UNICAMP.

Pietrella D, Angiolella L, Vavala E, Rachini A, Mondello F, Ragno R, et al. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med*. 2011 Feb 28; 11(1):18.

Ramage G, Walle KV, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; (45): 2475-79.

Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V, Hemapriya J, Kannan R. Virulence Factors and Anti-Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* sp. Isolated from HIV and TB Patients. *Indian J Microbiol.* 2010 Jul; 51(3):273–8.

Rex JH; Walsh TJ; Sobel JD; Filler SG; Pappas PG; Dismukes WE; Edwards JE. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Treatment Guidelines for Candidiasis*, 2000; 662-678.

Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol.* 1988; 23:127-49.

Raut J, shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida* species. *Biofouling.* 2013; 29(1):87-96.

Rodrigues ME, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Novel strategies to fight *Candida* species infection. *Crit Rev Microbiol.* 2014 Nov 10; 1–13.

Rogero SO; Lugão AB; Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Vol. 6, No. 3, 2003 *Materials Research IPEN/CNEN-SP*, 2003; 6 (3): 317-320.

Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharm.* 2012;2012:1–6.

Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Naves PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Ver. Ciênc. Méd. Biol.* 2013; 12 (2): 229-233.

Samaranayake YH; Ye J; Yau JYY; Cheung BPK; Samaranayake LP. In Vitro Method To Study Antifungal Perfusion in *Candida* Biofilms. *Journal of clinical microbiology*, 2005: 43(2): 818–825.

Sardi JCO, Duque C, Mariano FS, Peixoto ITA, Höfling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *Journal of Oral Science*. 2010; 52(2): 177-185.

Sharma V, Hussain S, Gupta M, Saxena AK. In vitro anticancer activity of extracts of *Mentha* spp. against human cancer cells. *Indian J Biochem. Biophys.* 2014;51 (5) 416-9.

Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *Journal of Biomedical material research*. 2010; 94: 149-156.

Singh-Babak SD, Babak T, Diezmann S, Hill JA, Xie JL, Chen Y-L, et al. Global analysis of the evolution and mechanism of echinocandin resistance in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):1002718.

Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 2006; 77: 279–285.

Schulze J, Sonnenborn U. Yeasts in the gut: from commensals to infections agents. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2009; 106(51):837-841.

Singh R, Shushni MAM, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab J Chem*. 2011; 8(3):322-28.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monges A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*, v.82, p.1107-1112, 1990.

Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Oct; 9(10):737–48.

Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* 2008; 16(6): 261-68.

Tsang PW-K, Bandara HMHN, Fong W-P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. *PloS One*. 2012;7(11).

Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol* 2009; 4 (10): 1235-1237.

Vasconcelos LS; Sampaio FC; Albuquerque AJR; Vasconcelos LCS. Cell Viability of *Candida albicans* Against the Antifungal Activity of Thymol. *Brazilian Dental Journal*, 2014; 25(4): 277-281.

Valeriano C, Piccoli RH, Cardoso MG, Alves E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. *Ver Brás plantas med.* 2012; 14(1): 57-67.

Veiga VF Jr, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova.* 2005; 28 (3): 519-28.

Vylkova S, Carman AJ, Danhof HA, Collette JR, Zhou H, Lorenz MC. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *mBio.* 2011;2(3):e00055–00011.

Zordan R, Cormack B. Adhesins in opportunistic fungal pathogens. In *Candida and Candidiasis*, 2 ed. Calderone RA, Clancy CJ. ASM Press; 2012: 243-59.

Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoides inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine.* 2011; 18:1181-1190.

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One.* 2012; 7(5): 36952. doi:10.1371/journal.pone.0036952.

Weems JJ. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis.* 1992; (14): 756-66.

ANEXO I- Composição dos meios de cultura utilizados**RPMI-1640 (meio para testes de susceptibilidade aos antifúngicos)**

L-glutamina 46,5g

Glicose 20g

Água destilada 1000mL

Ácido morfolinopropanosulfônico 0,165M

Ausência de bicarbonato de sódio

MOPS- 34,53g

Esterilizado por filtração em filtro biológico

Ágar Sabouraud Dextrose (SDA)

Peptona 10g

Glucose 40g

Ágar bacteriológico 15g

Água destilada 1000mL

Autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Extrato de levedura 10g

Peptona 10g

Glicose 20g

Água destilada 1000mL

Autoclavado por 15 minutos a 121°C.

ANEXO II- Certificado de aprovação do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da atividade anti-Candida de espécies de *Mentha* e seus compostos bioativos, isolados ou em associação, e seus efeitos sobre as células fúngicas", protocolo nº 150/15, dos pesquisadores **JOSÉ FRANCISCO HOFLING, GIOVANA CLAUDIA BONI, PRISCILLA DE LAET SANTANA MARIANO, PAULA CRISTINA ANIBAL, SIMONE NATALY BUSATO e THAÍS ROSSINI DE OLIVEIRA** satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/02/2016.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Evaluation of anti-Candida activity of *Mentha* species and their bioactive compounds, isolated or in combination, and their effects on the fungal cells", register number 150/15, of **JOSÉ FRANCISCO HOFLING, GIOVANA CLAUDIA BONI, PRISCILLA DE LAET SANTANA MARIANO, PAULA CRISTINA ANIBAL, SIMONE NATALY BUSATO and THAÍS ROSSINI DE OLIVEIRA** comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Feb 17, 2016.


Prof. Fernanda Miori Pascon

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.