



FUNDAÇÃO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS



THAINÁ DE MELO CARLOS DIAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*

**UBÁ - MINAS GERAIS
2016**

THAINÁ DE MELO CARLOS DIAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Fundação Presidente Antônio Carlos, como parte das exigências do curso de graduação em Farmácia, para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Orientador: Msc. César Augusto Caneschi

**UBÁ
2016**

THAINÁ DE MELO CARLOS DIAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha piperita* SOBRE CEPAS DE *Candida albicans*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Fundação Presidente Antônio Carlos, como parte das exigências do curso de graduação em Farmácia, para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

APROVADA: de dezembro de 2016

Luiz Gustavo Oliveira
(FUPAC)

France Araújo Coelho
(FUPAC)

César Augusto Caneschi
(Orientador)

RESUMO

A levedura *Candida albicans* é a principal causadora de infecções fúngicas invasivas em humanos. No entanto, os antifúngicos disponíveis no mercado apresentam eficácia reduzida, elevado custo, além de proporcionarem efeitos adversos. Desta forma, existe a necessidade de pesquisas por novos agentes antifúngicos, sendo as espécies vegetais uma fonte em potencial para a descoberta de compostos farmacológicos ativos. Neste sentido, o objetivo da pesquisa é avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de *Mentha piperita* frente a cepas de *C. albicans*. O óleo essencial foi obtido comercialmente e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. O potencial antifúngico do óleo foi avaliado sobre a cepa ATCC 10231 e um isolado clínico, sendo sua concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) testadas na faixa 0,15 a 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em função do constituinte majoritário através do método de microdiluição em placa de 96 poços. Os fármacos controle foram Itraconazol, Anfotericina B e Nistatina. O constituinte majoritário do óleo foi o mentol (43,18 %). A CIM e CFM frente à linhagem ATCC 10231 e sobre o isolado clínico foi de 312,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o que demonstra o potencial antifúngico do óleo essencial de *M. piperita* às cepas avaliadas. Os resultados foram promissores para a realização de novas pesquisas, no entanto, torna-se necessária a avaliação de sua toxicidade e a análises mais específicas para elucidação de seu provável mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Mentha piperita*. Óleo essencial. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Candida albicans yeast is a major cause of invasive fungal infections in humans. However, antifungal agents available on the market have reduced efficacy, high cost, and have adverse effects. Thus, there is a need for research on new antifungal agents, with plant species being a potential source for the discovery of active pharmacological compounds. In this sense, the objective of the research is to evaluate the antifungal potential of *Mentha piperita* essential oil against strains of *C. albicans*. The essential oil was obtained commercially and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The antifungal potential of the oil was evaluated on the strain ATCC 10231 and a clinical isolate, being its minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) tested in the range of 0.15 to 5,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ as a function of the major constituent through the 96 wells plate microdilution method. The control drugs were itraconazole, Amphotericin B and Nystatin. The major constituent of the oil was menthol (43.18%). The MIC and MFC compared to ATCC 10231 and the clinical isolate was 312.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ which demonstrates the antifungal potential of *M. piperita* essential oil to the strains evaluated. The results were promising for further research, however, it is necessary to assess its toxicity and more specific analyzes to elucidate its probable mechanism of action.

Keywords: *Candida albicans*. *Mentha piperita*. Essential oil. Antifungal activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 METODOLOGIA.....	7
2.1 LOCAL DE ESTUDO.....	7
2.2 ÓLEO ESSENCIAL.....	7
2.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	8
2.4 MICRO-ORGANISMOS.....	8
2.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	8
2.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	8
2.7 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA	9
3 RESULTADOS.....	10
4 DISCUSSÃO.....	12
5 CONCLUSÃO.....	15
REFERÊNCIAS.....	16

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores causadoras de infecções fúngicas invasivas, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e diabéticos, sendo *Candida albicans* a responsável pela maior porcentagem dessas infecções e agravos à saúde (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2009; SARDI *et al.*, 2013), como apontam vários estudos (HORN *et al.*, 2009; MOTTA *et al.*, 2010; DEMITTO *et al.*, 2012; GUNTHER *et al.*, 2014; MENESES *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

A espécie *C. albicans* possui fatores de virulência como a capacidade de se adaptar na forma leveduriforme e de pseudo-hifa, facilitando sua fixação no tecido e em dispositivos médicos, sendo também capaz de produzir biofilmes por meio da formação de uma matriz extracelular e produzir enzimas como fosfolipases e proteinases (DE ROSSI *et al.*, 2011; FINKEL e MITCHELL, 2011; RAMAGE *et al.*, 2012; ARAÚJO, 2013; SARDI *et al.*, 2013; KOHLER, CASADEVAL e PERFECT, 2015), o que caracteriza importante risco para a saúde. Estudos relatam ainda a existência de mutações desse fungo, que podem lhe conferir resistência e favorecer a infecção (NETT *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2013; FUENTES *et al.*, 2014). Neste sentido, o tratamento é prejudicado, pois existe uma limitação dos agentes antifúngicos disponíveis no mercado em função do reduzido número de compostos os quais, não raro, apresentam eficácia reduzida, custo elevado e proporcionam efeitos adversos aos pacientes, sendo assim, existe a necessidade de realização de pesquisas para a descoberta de novos fármacos antifúngicos (SAMMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2010; SARDI *et al.*, 2013; ZIDA *et al.*, 2016).

As plantas caracterizam uma relevante opção para estudos sobre suas propriedades antifúngicas, pois são de fácil acesso, além de serem muito utilizadas na medicina popular, sendo fonte de possível descoberta de novos compostos farmacológicos ativos e mecanismos de ação diferenciados, com reduzidos efeitos tóxicos (SAMMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2010; SARDI, ALMEIDA e GIANNINI, 2011).

Os óleos essenciais são importantes componentes das plantas, extremamente empregados como agentes flavorizantes na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e perfumarias, apresentando grande valor econômico (RAUT e KARUPPAYIL, 2014). São conhecidos por possuírem variadas atividades farmacológicas, dentre elas a atividade antifúngica, sendo explicada pela presença de aldeídos, álcoois e compostos fenólicos, como

linalol, geraniol, citral, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2010). Isto posto, os óleos essenciais são um importante alvo de pesquisas nesse âmbito.

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas espécies vegetais, entre essas pode-se mencionar as plantas do gênero *Mentha*. Estas distribuem-se pelo mundo todo e conseguem se adaptar tanto em temperaturas baixas como no clima tropical, sendo o mentol o constituinte majoritário predominante dos seus óleos essenciais (MONTEIRO, 2009).

A espécie vegetal *Mentha piperita*, conhecida popularmente como Hortelã-pimenta pertence à família Lamiaceae (GRANDI, 2014) a qual apresenta diversas espécies vegetais com potencial antifúngico (RAUT e KARUPPAYIL, 2014; TRIVELLINI *et al.*, 2016). Está incluída na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2009) e seu óleo essencial possui considerável interesse comercial e econômico, sendo utilizado em produtos de higiene bucal, na indústria alimentícia e farmacêutica (SIMÕES *et al.*, 2010). Esse óleo possui compostos terpênicos como mentol e limoneno (AGARWAL, LAL e PRUTHI, 2008; DJILANI e DICKO, 2012), que já demonstraram possuir efeito antifúngico sobre *C. albicans* (VIRIATO, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial antifúngico do óleo volátil de *M. piperita* frente cepas de *C. albicans*.

2 METODOLOGIA

2.1 LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental realizado no laboratório do Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) do Núcleo de Pesquisa e Inovação em Ciências da Saúde (NUPICS), localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no qual foi analisado o potencial antifúngico do óleo essencial de *M. piperita* frente a duas cepas de *C. albicans*.

2.2 ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *M. piperita* foi obtido comercialmente da empresa Laszlo Aromatologia (Laszlo, Brasil), o mesmo foi extraído por arraste a vapor d'água. Este foi caracterizado no laboratório de cromatografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial teve sua composição em porcentagem determinada por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em um cromatógrafo de gás HP 7820A (Agilent) de Coluna BP20 15m x 0,25 µm (SGE); temperatura da coluna de 50°C (0 min), 3°C/min, até 200°C; injetor a 200°C Split (1:50); detector FID a 220°C; gás de arraste H₂ a 3 mL/min; volume de injeção 1 uL e software de aquisição de dados EZChrom Elite Compact (Agilent). Os compostos do óleo essencial foram identificados por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa utilizando um equipamento GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu) de coluna BP20 15 m x 0,22 mm x 0,25 µm (SGE); temperatura da coluna de 50°C (3min), 3°C/min, até 200°C; injetor a 200°C Split (1:10), interface CG-MS a 220°C; detector MS (impacto eletrônico a 70 eV) a 220°C; gás de arraste Hélio a 2,0 mL/min; volume de injeção 1 uL e software para obtenção de dados GCMS solution (Shimadzu).

2.4 MICRO-ORGANISMOS

O potencial antifúngico do óleo essencial foi avaliado sobre a cepa de *C. albicans* ATCC 10231, fornecida pelo Laboratório de Micro-organismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e sobre um isolado clínico, proveniente do Laboratório Maurílio Baldi do Hospital Universitário da UFJF.

2.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação do potencial antifúngico consistiu na obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) utilizando o método de microdiluição em placas de 96 poços de acordo com o protocolo M27-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2002).

2.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA - CIM

Para determinação da CIM foi realizado um inóculo com as cepas supracitadas crescidas em ágar *Sabouraud* Dextrose (SDA) (Himedia, Índia) após repique realizado a 48 h (CLSI, 2002). Foram adicionados cerca de 4 mL de solução salina 0,9 % (p/v) estéril sobre as colônias para a formação da suspensão fúngica. A suspensão foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e diluída com salina 0,9 % (p/v) estéril e homogeneizado em vórtex (Genie 2, Scientific Industries, USA). A suspensão formada foi padronizada em espectrofotômetro (Libra S12, Biochrom, UK) com o auxílio de uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho

óptico e transmitância ajustada a 89 % no comprimento de onda de 530 nm (CLSI, 2002; FALAHATI, NOZARI e MAKHDOOMI, 2014).

A suspensão padronizada foi submetida a duas diluições, 1:50 e 1:20, para obtenção do número de células recomendado na microplaca de 96 poços (5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹) (CLSI, 2002). O meio de cultura líquido inoculado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Himedia, Índia) tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (J. T. Baker) estéril no pH 7,0 e esterilizado em um filtro de 0,22 µm.

Os fármacos utilizados como controle foram Itraconazol e Anfotericina B, ambos testados na faixa de concentração de 0,0313 a 16 µg.mL⁻¹ (CLSI, 2002) e Nistatina (com potência de 6028 UI/mg) no intervalo de 0,5 a 64 UI.mL⁻¹.

Uma alíquota do óleo essencial de *M. piperita* foi empregada para o preparo de soluções estoque com o dobro da concentração avaliada, devido à ocorrência de uma diluição 1:1 ao adicionar o meio de cultura inoculado na microplaca.

O óleo essencial teve seu valor de pureza ajustado em função do teor do seu constituinte majoritário (CANESCHI *et al.*, 2015) e foi avaliado na faixa de 0,15 a 5.000 µg.mL⁻¹. Foram utilizados 83,33 % do volume de óleo essencial empregado da solução de *Tween 80*: DMSO PA para a solubilização do mesmo em RPMI 1640 tamponado com MOPS.

Foram adicionados na microplaca 100 µL do inóculo de cada micro-organismo contendo em média 15×10^2 UFC.mL⁻¹ (CLSI, 2002), com exceção do controle negativo. Em seguida foram acrescentados 100 µL de cada diluição da substância testada e dos fármacos de referência em cada respectivo poço. O controle negativo foi 200 µL do meio de cultura RPMI 1640 tamponado com MOPS sem inóculo. Nos poços referentes ao controle positivo foram adicionados 100 µL do meio de cultura inoculado e 100 µL de meio de cultura não inoculado.

A microplaca foi homogeneizada em agitador de microplaca (SI-0400, Genie Scientific, Estados Unidos) por dois minutos na velocidade três dentro do fluxo laminar. Logo após foi vedada com fita adesiva e incubada na estufa por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

A CIM foi considerada a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento, visualmente detectado do micro-organismo (CLSI, 2002).

2.7 CONTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA - CFM

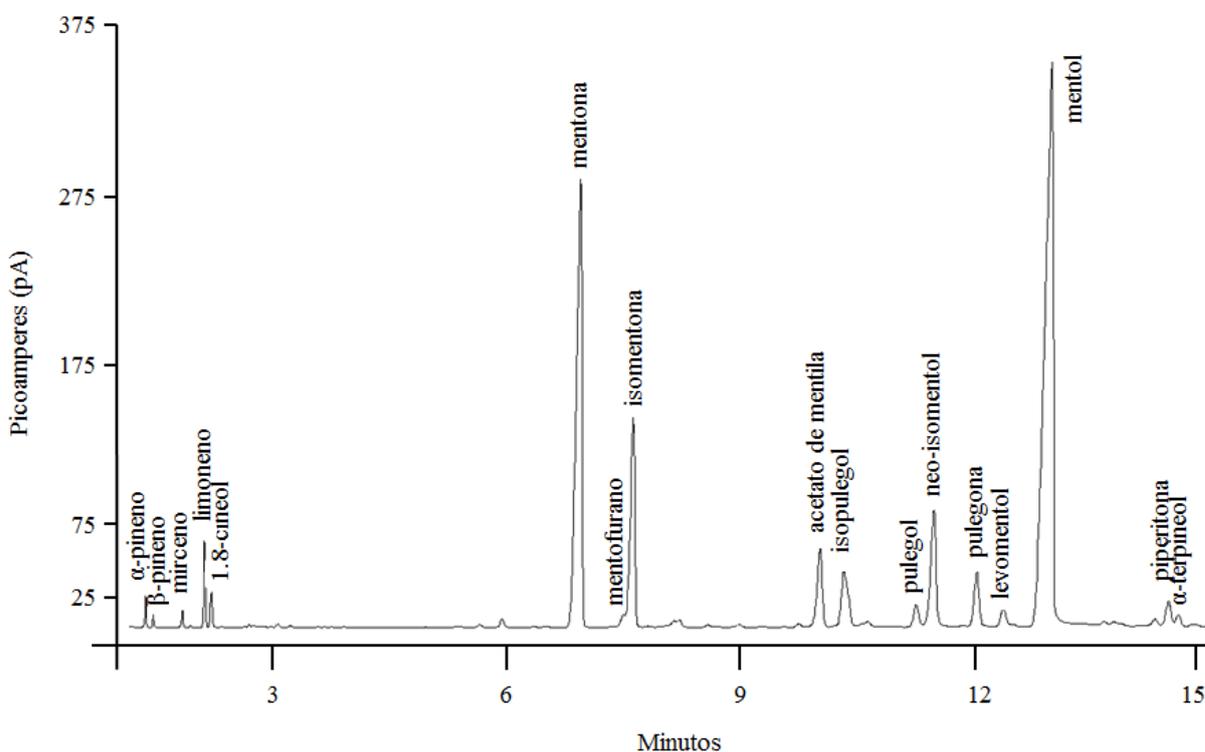
Após a determinação da CIM, foi avaliada CFM do óleo essencial e dos fármacos controle. Para tanto, foram retirados 5 µL de cada poço em que não houve crescimento fúngico e transferidos para criotubos contendo 1,0 mL de caldo *Sabouraud Dextrose* (SDB) (Himedia, Índia), sendo incubado em uma estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h. Nos criotubos em que

houve crescimento fúngico, a concentração das substâncias referente aos mesmos foi considerada fungistática e nos que não houve crescimento, fungicida.

3 RESULTADOS

O óleo essencial de *M. piperita* submetido à cromatografia gasosa de alta resolução e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa revelou a presença de dezessete componentes representativos, sendo o mentol o constituinte majoritário (43,18 %) (Figura 1 e Tabela 1).

Figura 1: Perfil cromatográfico do óleo essencial de *M. piperita*



Fonte: O autor.

Tabela 1: Perfil químico do óleo essencial de *M. piperita*

Pico	RT min*	Área	Concentração (%)	Índice Retenção Coluna BP20	Composto
1	1.288	190214	0.38	1209	α -pineno
2	1.388	77329	0.16	1213	β -pineno
3	1.766	124381	0.25	1226	mirreno
4	2.056	678711	1.37	1237	limoneno
5	2.143	329614	0.67	1240	1.8-cineol
6	6.941	11148553	22.53	1411	mentona
7	7.491	202317	0.41	1431	mentofurano
8	7.622	4273790	8.64	1436	isomentona
9	10.047	1815210	3.67	1522	acetato de mentila
10	10.357	1730874	3.50	1533	isopulegol
11	11.294	494325	1.00	15.67	pulegol
12	11.522	2821702	5.70	1575	neo-isomentol
13	12.081	1243534	2.51	1595	pulegona
14	12.423	499576	1.01	1607	levomentol
15	13.058	21362538	43.18	1630	mentol
16	14.568	602280	1.22	1684	piperitona
17	14.695	243271	0.49	1689	α -terpineol
			3.07		outros

Fonte: O autor.

(*) RT min: tempo de retenção em minutos

O óleo essencial de *M. piperita* apresentou CFM de 312,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tanto para a cepa padrão quanto para o isolado clínico. O fármaco controle Anfotericina B teve CFM de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa ATCC 10231 e a cepa clínica, respectivamente. A Nistatina teve CFM de 16 UI. mL^{-1} (2,654 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a cepa padrão e de 5 UI. mL^{-1} (0,829 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para o isolado clínico (Tabela 2).

Tabela 2: Susceptibilidade *in vitro* de *C. albicans* frente ao óleo essencial de *M. piperita*, Itraconazol, Anfotericina B e Nistatina.

Linhagens de <i>C. albicans</i>	Óleo essencial de <i>M. piperita</i>		Itraconazol		Anfotericina B		Nistatina	
	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM*	CFM*	CIM**	CFM**
ATCC 10231	1,2	312,5	>64	-	0,125	0,5	8	16
Isolado clínico	4,8	312,5	>64	-	0,5	16	0,5	5

Fonte: O autor.

(*) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (**) UI. mL^{-1}

4 DISCUSSÃO

Os principais constituintes do óleo essencial em estudo foram mentol e mentona, cujas concentrações estão de acordo com os intervalos definidos pela Farmacopeia Brasileira, que são de 35 a 79 % para mentol e de 6 a 30 % para mentona (BRASIL, 2010). Mimica-Dukic e colaboradores (2003) encontram no óleo volátil de *M. piperita* um teor de 39,63 % de mentol, resultado próximo ao do presente estudo, porém uma concentração de mentona de 8,93 %. No trabalho realizado por Yadegarinia e colaboradores (2006), o óleo essencial de *M. piperita* teve como principais constituintes o α -terpineno (19,7 %) e o óxido de piperitona (19,3 %) e os valores de mentol e mentona foram respectivamente 3,6 e 0,8 %, resultado diferente ao da presente pesquisa, que não encontrou a presença de α -terpineno e óxido de piperitona, bem como apresentou concentrações de mentol e mentona muito superiores. Saharkhiz e colaboradores (2012) encontraram no óleo essencial de *M. piperita* um teor de 53,28 % de mentol e 15,10 % de acetato de mentila, sendo o teor de mentona de 2,45 %, o qual é menor que óleo deste estudo e percentuais de mentol e acetado de mentila maiores.

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. piperita* da pesquisa de Ahmad e colaboradores (2014) foram mentol (34,82 %) e carvona (19,54 %), a concentração de mentona foi de 9,10 %, o que difere da presente pesquisa por possuir teores de mentol e mentona menores e pelo fato de não ter sido encontrado carvona no óleo estudado. Na pesquisa de Barros e colaboradores (2015) os principais constituintes do óleo essencial de *M. piperita* foram carvona (49,27 %), que não foi encontrada no óleo em estudo, e limoneno (37,18 %), detectado em uma concentração muito inferior neste trabalho. Todos os estudos supracitados tiveram o óleo essencial extraído por hidrodestilação e caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

O perfil químico dos óleos essenciais pode variar por conta de inúmeros fatores como o clima, localização geográfica da planta, aplicação de fertilizantes sobre a mesma, tipo de solo, parte da planta empregada para a extração, estresse durante o crescimento desta (como ataque de insetos), época da colheita, forma de armazenamento e secagem da planta e método de extração (BAKKALI *et al.*, 2008; STEFFENS, 2010; RAUT e KARUPPAYIL, 2014). Isto pode justificar a diferença de concentração e de constituintes do óleo empregado nesta pesquisa e nos demais estudos citados.

O método de extração do óleo essencial em estudo foi o arraste a vapor d'água, que, em relação ao método de hidrodestilação, possui a vantagem de ser mais simples e barato, além de proporcionar a extração de óleos essenciais com maior rapidez e qualidade, pois no

método de hidrodestilação o grande tempo em que a planta fica em contato com a água pode ocasionar a degradação de seus componentes (SILVEIRA *et al.*, 2012).

O mentol, componente majoritário do óleo deste trabalho, pode ter contribuído para o efeito antifúngico diante das linhagens de *C. albicans* assim como foi mencionado por Matos e colaboradores (2009), bem como outros estudos atribuem a este constituinte o potencial antisséptico, sendo largamente empregado com esta finalidade como componente de enxaguastes bucais (BALLIANA, 2012). Porém, mesmo que muitas vezes a atividade de um óleo volátil seja associada ao percentual de seus constituintes majoritários, deve-se considerar que estes são formados por um complexo de compostos químicos e que sua ação antifúngica pode estar associada a um único componente ou a uma associação sinérgica entre os mesmos. Por tal motivo é importante conhecer o perfil cromatográfico dos óleos ao ser testada uma ação farmacológica (BAKKALI *et al.*, 2008).

O óleo essencial de *M. piperita* teve CIM e CFM superior aos controles Anfotericina B e Nistatina, o que revela menor eficácia que esses fármacos. Porém, a atividade do óleo não deve ser ignorada, pois mesmo que a Anfotericina B seja considerada padrão ouro para o combate a infecções disseminadas de vários fungos, este apresenta grande toxicidade. Deve-se considerar também que o emprego da Nistatina limita-se a infecções por *Candida* na pele, no trato gastrointestinal e nas membranas mucosas (RANG *et al.*, 2011).

Em relação ao Itraconazol, ambas as cepas estudadas mostraram-se resistentes, uma vez que cepas que apresentem CIM maior que $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para este fármaco, são resistentes ao mesmo (CLSI, 2002). Isso reforça que a resistência fúngica é um problema emergente e que novos agentes antifúngicos devem ser estudados.

Barros e colaboradores (2010), ao testar a atividade antifúngica do óleo essencial de *M. piperita* sobre *C. albicans* por meio do método de microdiluição em placas de 96 poços estabelecido pelo protocolo M27-A2 (CLSI, 2002) não encontraram nenhum efeito inibitório na faixa de 9,7 a $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O perfil químico desse óleo foi muito diferente ao da presente pesquisa como mencionado, o que pode justificar a ausência de CIM dentro da faixa testada, embora o método empregado tenha sido o mesmo. Saharkhiz e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antifúngica do óleo da mesma espécie supracitada sob o mesmo protocolo frente a 6 cepas de *C. albicans* e encontraram o valor médio de CIM de $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com variação de 1 a $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado semelhante à CIM encontrada na análise deste estudo para a cepa padrão e com pequena variação para o isolado clínico. No entanto, o valor da CFM encontrado por estes autores foi de $3,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em média, com variação entre 2 a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado mais promissor em relação ao da presente pesquisa. Como já citado, os

dois óleos tiveram variações significativas em relação ao teor de seus constituintes, o que pode ter ocasionado a diferença entre os resultados.

No estudo de Ahmad e colaboradores (2014), no qual foi utilizado o método de macrodiluição em caldo, o óleo de *M. piperita* apresentou CIM de 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM de 1.600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 90028. Ao estabelecer uma comparação, o resultado do presente estudo foi mais satisfatório, tanto para a cepa ATCC 10231, quanto para o isolado clínico. É importante destacar que os constituintes do óleo desta pesquisa e a citada anteriormente tiveram variação e que os métodos empregados para testar CIM e CFM foram diferentes, o que pode ter influenciado nos resultados. De acordo com o protocolo M27-A2 (CLSI, 2002), já existem várias evidências de que o método de microdiluição possui excelente concordância com o método de macrodiluição, por tal motivo, este órgão descreveu uma adaptação do teste de sensibilidade de leveduras a antifúngicos para o teste de microdiluição, sendo este método de mais fácil execução, além de implicar em menores gastos com materiais de consumo.

No estudo de Carreto e colaboradores (2010), em que foi empregado o método de difusão em ágar, 68 % das cepas de *C. albicans* testadas foram sensíveis ao óleo de *M. piperita*, com zonas de inibição entre 5 e 10 mm. Castro e Lima (2011), ao utilizar o mesmo método de Carreto e colaboradores (2010) encontraram halos de inibição de 11 a 19 mm para o óleo de *M. piperita* frente a *C. albicans*. No estudo de Geromini e colaboradores (2012), ao empregar o método de difusão em ágar, foi observado um halo 17 mm de inibição do óleo essencial de *M. piperita* sobre *C. albicans*. Todos esses estudos tiveram semelhança ao presente trabalho por possuírem a capacidade de inibir o crescimento de cepas de *C. albicans*, porém não se pode comparar a eficácia dos óleos testados pelo fato de o método de difusão em ágar não fornecer resultados quantitativos. Com este método não se consegue determinar qual a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um micro-organismo, resultado que se limita à medição da zona de inibição de crescimento do mesmo (OTROSKY *et al.*, 2008).

A CIM do óleo essencial e da Anfotericina B foram maiores para o isolado clínico do que para a cepa padrão ATCC 10231, fato este que pode ser remetido a um possível desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte do isolado clínico.

O mecanismo de ação antifúngica dos óleos essenciais ainda não foi totalmente elucidado, porém já foi relatado que a característica hidrofóbica dos mesmos pode facilitar a interação destes com as membranas lipídicas dos fungos, fazendo com que fiquem mais

permeáveis e sejam eliminados eletrólitos, que são determinantes para a sobrevivência das células (ALMEIDA, 2011; CASTRO E LIMA, 2011).

5 CONCLUSÃO

Em suma, o óleo essencial de *M. piperita* revelou atividade antifúngica sobre cepas de *C. albicans*, apresentando 17 componentes representativos, sendo o mentol o majoritário.

Diante desses resultados, é importante e válido estudar a atividade do óleo como fármaco antifúngico *in vivo*. Além disso, é necessário avaliar sua toxicidade em diferentes concentrações, realizando também análises mais específicas para elucidação de seu provável mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, v. 165, p. 13–19, 2008.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; SAMBER, N.; MANZoor, N. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* essential oil in combination with silver ions. **Sinergy**, v. 1, p. 92-98, 2014.
- ALMEIDA, L. F. D. **Atividade antifúngica de óleos essenciais frente à *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- ARAÚJO, F. C. **Candidemias e resistência aos antifúngicos**. 2013. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Biomedicina) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALLIANA, R. C. S. **Avaliação da atividade antifúngica de extratos vegetais e antissépticos bucais em *Candida albicans***. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
- BARROS, A. S.; MORAIS S. M.; FERREIRA, P. A. T.; VIEIRA, I. G. P.; CRAVEIRO, A. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MENEZES, J. E. S. A.; SILVA, F. W. F.; SOUSA, H. A. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 557-564, 2015.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS**. 2009.
- CANESCHI, C. A.; MARTINS, F. J.; LARRUDÉ, D. G.; ROMANI, E. C., BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. *In vitro* Antifungal Activity of *Baccharis trimera* Less (DC) Essential Oil against Dermatophytes. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 11, p. 2083-2089, 2015.
- CARRETO, C. F. P.; ALMEIDA, R. B. A.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; JUNQUEIRA, J. C.. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. against *Candida* spp. **Brazilian Dental Science**, v. 13, n. 1, p. 4-9, jan./jun. 2010.
- CARVALHO, V. O.; OKAY, T. S.; MELHEM, M. S.C.; SZESZS, M. W.; DEL NEGRO, G. M. B. The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n.3, p. 209–212, 2013.
- CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. *Screening* da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v. 11, n. 3, p. 341-345, jul./set. 2011.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002).

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILHERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 315-321, out. 2012.

DE ROSSI, T.; LOZOVY, M. A. B.; SILVA, R. V.; FERNANDES, E. V.; GERALDINO, T. H.; COSTA, I. C.; SARIDAKIS, H. O.; WATANABE, M. A. E.; FELIPE, I. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2011.

DJILANI, A.; DICKO, A. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. **Nutrition, Well-Being and Health**, 2012.

FALAHATI, M.; NOZARI, S.; MAKHDOOMI, A. Comparison of antifungal effect of nanosilver particles alone and in combination with current drugs on candida species isolated from women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2014.

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, n.2, p. 109–118, Feb. 2011.

FUENTES, M.; HERMOSILLA, G.; ALBURQUENQUE, C.; FALCONER, M. A.; AMARO, J.; TAPIA, C. Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. **Revista Chilena Infectología**, v. 31, n.5, p. 511-517, 2014.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umurama, v. 15, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2012.

GRANDI, T. S. M. **Tratado de plantas medicinais**: mineiras, nativas e cultivadas. 1. ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014. 1204 p.

GUNTHER, L. S. A.; MARTINS, H. P. R.; GIMENES, F.; ABREU, A. L. P.; CONSOLARO, M. E. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Prevalence of *Candida albicans* and non-albicans isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization, vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women. **São Paulo Medical Journal**, v. 132, n.2, p.116-20, 2014.

HORN, D. L.; NEOFYTOS, D.; ANAISSIE, E. J.; FISHMAN, J. A.; STEINBACH, W. J.; OLYAEI, A. J.; MARR, K. A.; PFALLER, M. A.; CHANG, C.; WEBSTER, K. M. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective

Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, n. 48, p. 1695–1703, Jun. 2009.

KOHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2015.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidante activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, v. 69, p. 413-419, 2003.

MONTEIRO, R. **Desenvolvimento de menta e produção de óleo essencial sob diferentes condições de manejo**. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MENEZES, R. P.; BORGES, A. S.; ARAUJO, L. B.; PEDROSO, R. S.; RÖDER, D. V. D. B. Related factors for colonization by *Candida* species in the oral cavity of HIV- infected individuals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 413-419, Sep./Oct. 2015.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 5, p. 441-448, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NETT, J. E.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; ROSS, K. M.; ANDES, D. R. Interface of *Candida albicans* Biofilm Matrix-Associated Drug Resistance and Cell Wall Integrity Regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 12, p. 1660–1669, Dec. 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY L.; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 14 p., 2012.

RANG, H. P., DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p.250–264, 2014.

SAHARKHIZ, M. J.; MOTAMEDI, M.; ZOMORODIAN, K.; PAKSHIR, K.; MIRI, R.; HEMYARI, K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. **International Scholarly Research Network Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

SARDI, J. C. O.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. M. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites - A brief review. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 951 – 959, 2011.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic Potential of Plants as Antimicrobials for Drug Discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 283-294, Jun. 2010.

SILVA, M. G. C.; RODRIGUES, G. S.; GONÇALVES, I. L.; GRAZZIOTIN, N. A. *Candida* species distribution and fluconazole susceptibility of blood isolates at a regional hospital in Passo Fundo, RS, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 3, p. 158-161, Jun. 2015.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; COSTA JUNIOR, E. F. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.8, n.15; p. 2039, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.

SOUSA, I. A.; BRAOIOS, A.; SANTOS, T. G.; LIMA, J. A.; COSTA, R. M. Candiduria in adults and children: prevalence and antifungal susceptibility in outpatient of Jataí-GO. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 4, p. 259-264, ago. 2014.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TRIVELLINI, A.; LUCCHESINI, M.; MAGGINI, R.; MOSADEGHA, H.; VILLAMARIN, T. S. S.; VERNIERI, P.; MENSUALI-SODI, A.; PARDOSSI, A. *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 241–254, 2016.

VIRIATO, A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1249–1255, 2006.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A.; OUEDRAOGO-TRAORE, R.; GUIGUEMDÉ, R. T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, 2016.