

CLAUNENCIL DE FÁTIMA PIRES CARRETTO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Mentha piperita* L. SOBRE
LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

CLAUNENCIL DE FÁTIMA PIRES CARRETTO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Mentha piperita* L. SOBRE
LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP;2006.

Carretto, Claunencil de Fátima Pires

Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida* / Claunencil de Fátima Pires Carretto; orientadora Juliana Campos Junqueira. __São José dos Campos, 2007.

92p.; IL.

Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, área de Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

1. *Mentha piperita* – 2. *Candida* – 3. Resinas acrílicas

BLACK D 22

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26/06/2007.

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carretto CFP. Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida*. [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

São José dos Campos, 26 de junho de 2007.

Banca examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a)

Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura

2) Prof.(a). Dr.(a)

Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura

3) Prof.(a). Dr.(a)

Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura

DEDICATÓRIA

A Deus, todos os dias de minha vida.

**Ao meu marido FÁBIO,
fiel e amoroso companheiro,
que, nestes 11 anos de convívio,
foi o grande incentivador
em todos os meus projetos.
Obrigada pela ajuda, paciência
e atenção durante a realização
deste trabalho.**

**Aos meus pais, JOSÉ e SOPHIA,
pelo empenho em minha educação,
pelo exemplo, apoio, carinho e amor.**

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Juliana Campos Junqueira,

**pela orientação competente e dedicada,
pela confiança em mim depositada,
pela oportunidade de crescimento científico,
pela amizade, atenção, paciência durante a realização desse
trabalho,
pelo exemplo de professora e pesquisadora,**

toda a minha gratidão e minha admiração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior e do vice-diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues.

À Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela competência e dedicação com que administra este curso, pelo auxílio e amizade.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de minha bolsa de estudo.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por toda atenção e colaboração destinada a mim e a este trabalho, pelo exemplo de professor e pesquisador.

À Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, pela amizade e convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Dias Colombo, pela disponibilidade e considerações prestadas no exame de qualificação de meu mestrado.

À Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, pela amizade e convivência.

À Profa. Dra. Mariko Ueno, pela disponibilidade e colaboração no ensino da extração do óleo essencial.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Furlan, pela disponibilidade e colaboração no fornecimento da planta *Mentha piperita* para realização deste trabalho.

À Iara Ribeiro Dias, funcionária do departamento de Agronomia da Universidade de Taubaté, pelo auxílio na coleta das amostras da planta.

À Tânia Cristina Sumita, funcionária do departamento de Biologia da Universidade de Taubaté, pela atenção e auxílio no ensino da extração do óleo essencial.

Ao Sérgio Alves, funcionário da Faculdade de Odontologia UNESP de São José dos Campos.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela amostra de *Candida glabrata*.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia, Patrícia, Edna, Thaís, Francine, Silvia, Graziella, pela amizade e companherismo. Agradeço também à aluna da graduação Rosemary Soares de Santana pela amizade e auxílio neste trabalho.

À Rosilene Batista de Aguiar Almeida, pela amizade, companherismo, dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

À Sílvia Scarpel por toda instrução, atenção e amizade.

À Ângela de Brito Bellini pela revisão da estrutura do trabalho e às demais funcionárias da biblioteca pela atenção e paciência.

Às secretárias da Seção de Pós-graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Lílian Faria das Graças e Maria Aparecida Consiglio de Souza, pela gentileza, presteza e disponibilidade no decorrer do curso.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia UNESP de São José dos Campos, especialmente à Maria de Fátima Pires.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho.

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	15
2.2 Plantas medicinais.....	19
2.3 <i>Mentha piperita</i> L.....	22
2.4 Plantas medicinais e leveduras do gênero <i>Candida</i>	27
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Coleta de <i>Mentha piperita</i> L.....	32
4.2 Preparo do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	33
4.3 Extração do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L.....	34
4.4 Preparo da infusão de <i>Mentha piperita</i> L.....	34
4.5 Leveduras do gênero <i>Candida</i>	35
4.6 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	36
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	36
4.6.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	37
4.7 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L.....	38
4.8 Avaliação dos efeitos da infusão de <i>Mentha piperita</i> L. sobre a aderência de <i>Candida</i> à resina acrílica.....	41
4.9 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	44

5.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	44
5.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	47
5.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L.....	51
5.3 Avaliação dos efeitos da infusão de <i>Mentha piperita</i> L. sobre a aderência de <i>Candida</i> à resina acrílica.....	54
6 DISCUSSÃO.....	56
6.1 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de <i>Mentha piperita</i> L.....	56
6.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L.....	60
6.3 Avaliação dos efeitos da infusão de <i>Mentha piperita</i> L. sobre a aderência de <i>Candida</i> à resina acrílica.....	63
7 CONCLUSÕES.....	65
8 REFERÊNCIAS.....	66
ANEXO.....	81
APÊNDICE.....	82
ABSTRACT.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida

C = controle

CIM = concentração inibitória mínima

CFM= concentração fungicida mínima

cm = centímetro

E = extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

g = grama

HIV = vírus da imunodeficiência humana

L = litro

Log = logaritmo

mg = miligrama

mL = mililitro

mm = milímetro

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

OMS = Organização Mundial da Saúde

PIB = produto interno bruto

ppm = partes por milhão

UFC = unidades formadoras de colônias

UI = unidade internacional

μL = microlitro

μm = micrômetro

% = porcentagem

°C = grau Celsius

°GL = grau Gay Lussac

Carretto CFP. Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que podem causar infecções superficiais ou sistêmicas. A investigação de plantas medicinais contra *Candida* spp. tem aumentado significativamente nos últimos anos. O presente estudo teve como objetivos avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre isolados clínicos de *Candida* spp. e observar o efeito da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de leveduras do gênero *Candida* à resina acrílica. O extrato hidroalcoólico e o óleo essencial de *Mentha piperita* L. foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana sobre diferentes espécies do gênero *Candida*, sendo cinquenta amostras de *C. albicans*, dez *C. glabrata*, dez *C. tropicalis*, oito *C. parapsilosis* e duas *C. krusei*. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico (500 g de planta fresca/1 L de etanol) foram determinadas pelo método da diluição em caldo. O grupo controle constituiu-se de etanol na mesma concentração do extrato (79°GL). A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi realizada por meio do teste de difusão em ágar. Foi observado o efeito da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* à resina acrílica. Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. apresentou atividade fungistática para algumas cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e atividade fungicida sobre cepas de todas as espécies de *Candida* estudadas em relação ao grupo controle. O óleo essencial mostrou maior atividade inibitória para cepas de *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A infusão de *Mentha piperita* L. não foi capaz de inibir a aderência de *Candida* à resina acrílica em nenhuma das espécies testadas. Concluiu-se que *Mentha piperita* L. apresentou maior atividade antimicrobiana sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, mas não teve efeito sobre a aderência desses microrganismos à resina acrílica.

PALAVRAS - CHAVE: *Mentha piperita*; leveduras; *Candida*; testes de sensibilidade microbiana; óleos voláteis; plantas medicinais; resinas acrílicas.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias e os fungos têm capacidade genética de adquirir e transmitir resistência aos fármacos utilizados como agentes terapêuticos. O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de antimicrobianos, incerta. Portanto, torna-se necessário a adoção de medidas para enfrentar esse problema, como o controle do uso de antimicrobianos, o desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a elaboração de pesquisas sobre novos medicamentos, sintéticos e naturais⁵⁰.

As plantas sintetizam compostos químicos a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem. Muitos desses compostos podem provocar reações nos organismos, são os princípios ativos. Algumas dessas substâncias podem ou não ser tóxicas, dependendo da dosagem em que venham a ser utilizadas. Assim, planta medicinal é aquela que contém no mínimo um princípio ativo, conferindo-lhe atividade terapêutica⁵⁵.

Desde 1977, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido⁵⁰. Vários centros de pesquisa, em todo o mundo, vêm desenvolvendo estudos sobre as propriedades antimicrobianas das plantas medicinais, como África⁹, Austrália²⁴, Índia¹, Irã¹⁵, Itália⁸⁹, Turquia²⁹. No Brasil, também se realizam importantes pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas^{6,13,28,81 e 88}. No

entanto, faltam ainda evidências laboratoriais e clínicas sobre a eficácia e a segurança de seu emprego, tanto em animais como em seres humanos. Os supostos méritos terapêuticos que possuem devem-se, principalmente, a informações empíricas e subjetivas da medicina folclórica⁵⁰.

Muitos extratos e óleos essenciais isolados de plantas têm mostrado atividade antimicrobiana. As espécies vegetais têm sido usadas pelas características antimicrobianas, por meio de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Esta atividade antimicrobiana, na maioria das vezes, representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos⁸³.

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas, que podem causar infecções locais ou sistêmicas em indivíduos com fatores predisponentes, como tratamento prolongado com antibióticos e comprometimentos do sistema imunológico. Atualmente, os antifúngicos apresentam uso limitado devido a fatores como baixa potência, baixa solubilidade, toxicidade e o desenvolvimento de cepas resistentes. Assim, a investigação de produtos naturais contra *Candida* spp. aumentou significativamente nos últimos 10 anos, sendo estudadas mais de 250 espécies de plantas²⁸.

A menta (*Mentha piperita* L.), planta aromática da família Labiatae, produz óleo essencial rico em mentona (14-32%) e mentol (30-50%). O mentol possui larga aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, de higiene e do tabaco. Comercializa-se por ano mais de cinco mil toneladas de óleo essencial de menta, perfazendo o total de cinquenta milhões de dólares por ano⁷⁶.

Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar *in vitro* o efeito do extrato hidroalcoólico, da infusão e do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leveduras do gênero *Candida*

A candidose, uma das principais infecções fúngicas oportunistas do ser humano, é provocada por leveduras do gênero *Candida*, que fazem parte da microbiota residente do organismo humano. Essa infecção expressa bem a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota, podendo ir do comensalismo à doença sistêmica fatal⁵⁸.

Candida albicans é a principal espécie do gênero associada à candidose, mas outras também são relatadas, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. guilliermondii*⁵⁸.

Recentemente, *Candida dubliniensis* foi reconhecida como uma nova espécie cujas características morfológicas e bioquímicas são muito semelhantes à *C. albicans*, sendo necessária a utilização de métodos moleculares para diferenciá-las^{21 e 45}. Esta nova espécie foi descrita inicialmente na Irlanda, onde 17 a 35% dos pacientes com infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) estavam colonizados ou infectados por este agente na cavidade bucal²¹.

C. albicans é dimórfica, ou seja, apresenta duas formas de crescimento: levedura e hifa³². Na forma de levedura, apresenta-se como células globosas, Gram-positivas, ovaladas ou alongadas, medindo em média 3 a 7 µm de largura por 3 a 14 µm de comprimento. Quando na

forma de micélio, apresenta-se como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras^{93 e 49}.

O conhecimento da ecologia de leveduras revela que diversas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis e que estão amplamente distribuídas no meio ambiente, na fauna e flora, no solo e na água⁴⁷. Leveduras do gênero *Candida* são normalmente isoladas da cavidade bucal humana⁸⁷.

O dorso da língua parece ser o reservatório primário, enquanto o restante da mucosa, superfície dos dentes, biofilme dentário e saliva, constituem os reservatórios secundários⁸.

Leveduras do gênero *Candida* estão presentes na cavidade bucal de 3 a 48% de adultos e 45 a 65% das crianças saudáveis⁷⁸. Komiyama et al.⁴⁶ isolaram leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de 43,33% dos pacientes tratados com corticosteróides inalados e de 30% dos pacientes do grupo controle. Em HIV positivos, também, observou-se maior porcentagem de indivíduos positivos para leveduras na cavidade bucal (73,3%) e sítios periodontais (35,5%) em relação ao controle (46,6% da cavidade bucal e 11,1% dos sítios periodontais)¹⁰. Além disso, em pacientes submetidos à antibioticoterapia prolongada para o tratamento da tuberculose pulmonar o percentual de isolamento de *Candida* na cavidade bucal foi de 72% em relação ao grupo controle (52%)⁷³.

C. albicans possui potencial patogênico bastante conhecido. Apresenta como principais fatores de patogenicidade a capacidade de aderência a mucosas e superfícies inanimadas, como o acrílico; dimorfismo com produção de estruturas filamentosas que auxiliam a invasão tissular; a termotolerância significativa; e produção de enzimas como proteinases e fosfolipases²¹. A fase hifal apresenta aderência maior às células do organismo em relação à fase leveduriforme⁶⁵.

A adesão à mucosa bucal das espécies do gênero *Candida* provavelmente ocorre pela interação entre adesinas dos microrganismos e receptores das células epiteliais. Em *C. albicans* manoproteína, glucano, quitina, proteínas da parede celular e lipídios são possíveis adesinas^{65 e 93}. Em relação às possíveis moléculas que agem como receptores no hospedeiro tem-se laminina, colágeno, fibrinogênio, fibronectina^{16 e 93}.

Dentre os muitos fatores de virulência, a produção de proteinase por leveduras do gênero *Candida* tem obtido atenção. A proteinase é produzida por diferentes espécies de *Candida* e é capaz de degradar vários substratos como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular. Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas⁶⁴.

Várias funções foram propostas para proteinase durante infecção, como digestão das proteínas do hospedeiro para fonte de nutrientes, diminuição das defesas do hospedeiro por degradação das imunoglobulinas e proteínas do complemento, aderência e degradação das barreiras do hospedeiro durante a invasão⁹².

Quanto às fosfolipases, estas agem clivando os fosfolipídeos e, assim, alteram a estabilidade da membrana, ocasionando a lise celular. Além disso, parecem estar relacionadas com a produção de tubo germinativo, transição para a forma hifal e injúria tecidual^{35 e 62}.

Além da produção de enzimas, também foram isoladas duas toxinas a partir de *C. albicans*: uma de natureza protéica, candidotoxina, e a outra, glicoprotéica. A candidotoxina tem elevado poder antigênico e, quando tratada com formalina, transforma-se em toxóide. Em relação à toxina glicoprotéica, o açúcar dominante é a D-

manose, e sua toxicidade para camundongos é semelhante à observada com a candidotoxina⁴⁸.

Múltiplos fatores predisponentes à infecção por fungos na boca são citados na literatura, sendo rara a ocorrência de infecção sem a presença de um ou mais desses fatores⁶³. Entre os fatores locais incluem-se xerostomia, alteração da microbiota bucal pelo uso de antimicrobianos, dieta rica em carboidratos, câncer bucal, uso de próteses e aparelhos ortodônticos e associações com outras lesões. Entre os sistêmicos, são importantes os fatores endócrinos, nutricionais e imunológicos^{77,43,69,77 e 82}.

As formas clínicas da candidose podem ser: mucosa, cutânea e sistêmica. Na candidose mucosa, os tecidos mais atingidos são os da cavidade bucal e vaginal. Na cutânea, os tecidos mais comprometidos são as áreas intertriginosas da pele e das mãos, as virilhas e axilas. Na candidose sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando candidose pulmonar, endocardite, nefrite e fungemia. Dependendo da localização no organismo, a candidose pode se manifestar de diferentes formas. Os achados clínicos na candidose bucal são bastante variáveis, podendo ser observados desde quadros localizados até formas extensas⁵⁸.

Atualmente os tratamentos disponíveis para as candidoses estão limitados a alguns fármacos como anfotericina B, 5-fluorцитосина, fluconazol, cetoconazol, itraconazol. Entretanto, estes fármacos podem apresentar algumas limitações como toxicidade, interações entre fármacos, limitado espectro de ação antifúngica e desenvolvimento de resistência⁵.

Apesar do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis nos últimos anos, eles ainda encontram-se em desvantagem quando comparados aos antibióticos. A resistência aos antifúngicos tem representado grande desafio para a prática clínica¹². Segundo Teichert et al.⁹¹, aproximadamente 81% dos pacientes com

AIDS são colonizados por cepas de *Candida* resistentes aos antifúngicos azóis. Migliorati et al.⁵⁹ demonstraram que amostras isoladas de pacientes infectados pelo HIV com candidose orofaríngea apresentaram 52,2% das cepas de *C. albicans* resistentes ao cetoconazol, 30,4% ao fluconazol e 26% ao itraconazol. Posteraro et al.⁷² descreveram que amostras de *C. glabrata* isoladas do sangue e de culturas vaginais de paciente imunocompetente foram resistentes aos azóis. Amostras de *Candida* resistentes ao fluconazol e itraconazol também foram detectadas em isolados de crianças hospitalizadas³⁷.

Frente às dificuldades observadas no tratamento de micoses em alguns grupos de pacientes, recomenda-se, sempre que possível, o isolamento do agente responsável pela infecção e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos passíveis de utilização¹².

2.2 Plantas medicinais

A necessidade de desenvolvimento de novos fármacos que sejam efetivos contra agente etiológico de algumas infecções ainda sem tratamento adequado, e que possam substituir os existentes, porém a custos mais baixos e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. A síntese orgânica tem contribuído significativamente neste aspecto, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico. Cabe ressaltar, porém, que muitos destes fármacos são oriundos de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de plantas, que têm, ao longo dos anos, possibilitado a descoberta de inúmeras moléculas bioativas²⁰.

As plantas são importantes fontes de substâncias biologicamente ativas, ou seja, substâncias que possuem alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo diferente daquele no qual foi produzido, podendo apresentar atividade farmacológica. A diversidade estrutural e de propriedades químicas que essas substâncias ocorrem na natureza é impressionante, e muitas vezes podem ser utilizadas direta ou indiretamente para o desenvolvimento e síntese de um grande número de fármacos⁷⁹.

O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é bastante amplo e, em muitos casos, representa o único recurso terapêutico disponível para a população rural de países em desenvolvimento⁶⁷. Acredita-se que cerca de 80% da população mundial utilize as plantas como primeiro recurso terapêutico⁸⁴. As plantas usadas como remédio quase sempre têm posição predominante e significativa nos resultados das investigações etnobotânicas de uma região ou grupo étnico⁶⁷.

Atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais⁸⁴.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies⁷⁹. Entretanto, nos últimos vinte anos o número de informações sobre plantas medicinais cresceu apenas 8% anualmente. Um país biologicamente tão rico como o Brasil precisa incentivar as pesquisas com plantas medicinais. Afinal, elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais e à elevação do produto interno bruto (PIB), visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos³⁸.

Neste momento, sabe-se que as substâncias que geralmente são fontes de estudo quanto à atividade biológica são aquelas

que advêm do metabolismo secundário das plantas. Duas importantes características relacionadas aos metabólitos secundários são a grande variedade na qual são encontrados em cada espécie vegetal e o fato de que muitas vezes apresentam atividade biológica⁷⁹.

Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado promissores efeitos biológicos e a literatura científica relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior àquela de um fármaco, sendo que muitos deles encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados²⁰.

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas e de importância atualmente, podemos mencionar a forskolina, obtida de *Coleus barbatulus* (boldo), que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certas neoplasias; a artemisinina, presente em *Artemisia annua* (erva de São João), que exerce potente atividade antimalárica; e o anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que, após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se em grande esperança para pessoas portadoras de câncer de ovário e pulmão²⁰.

Estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões de faturamento da indústria farmacêutica nacional em 1996 sejam originados de medicamentos derivados de plantas. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização³⁹.

No período de 1983-1994 do total de medicamentos aprovados, 6% foram obtidos diretamente de espécies vegetais, sendo denominados produtos naturais, 24% são compostos derivados e 9% foram desenvolvidos a partir de compostos vegetais, cuja estrutura molecular serviu como unidade precursora em processos de síntese⁵³.

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Além disso, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às antimicrobianas a eles associadas³⁹.

Estima-se que, de cada dez mil princípios ativos estudados, apenas um se torna um fármaco. Esta estatística pode, a princípio, parecer desanimadora. Contudo, se considerarmos a imensa diversidade de substâncias potencialmente bioativas derivadas somente das plantas, esse dado pode não parecer tão discrepante, especialmente se compreendido de uma megadiversidade biológica tal como a do Brasil⁷⁹.

2.3 *Mentha piperita* L.

A menta (*Mentha piperita* L.) pertence à família Lamiaceae, também denominada Labiatae, que foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu e inclui mais de duzentos e cinquenta e dois gêneros, nos quais se distribuem seis mil e setecentas espécies, a maioria de arbustos e ervas e raramente árvores. Os principais gêneros desta família ocorrem em sete subfamílias, entre elas a subfamília Nepetoideae, que fazem parte os gêneros *Hyssopus*, *Melissa*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Hyptis* e *Plectranthus*²⁷.

Bem conhecida e comumente usada, a menta (*Mentha piperita* L) é um híbrido natural de *Mentha aquatica* L. e *Mentha spicata* L. Embora seja nativa da região mediterrânea, é cultivada em todo o mundo⁴².

As espécies do gênero *Mentha*, suas variedades, linhagens e híbridos oferecem no seu conjunto perspectivas particularmente interessantes para as pesquisas biológicas e fitoquímicas⁵⁶.

O gênero *Mentha* é altamente complexo e de difícil identificação específica, e as causas dessa complexidade são devidas à plasticidade morfológica, facilidade para hibridização, propagação vegetativa, cultivo desde a antiguidade e controvérsias nomenclaturais⁵⁶.

Essas espécies são muito importantes do ponto de vista econômico, e a maioria delas é caracterizada por uma grande diversidade química⁵⁶.

A espécie é chamada na região amazônica de hortelã-pimenta e, na Mata Atlântica, apenas de hortelã, nome recebido em todo o Brasil. Entre seus sinônimos estão hortelanzinho, hortelã-das-cozinhas, menta e hortelã-verdadeira²⁷.

É uma erva aromática, anual ou perene de mais ou menos 30 cm de altura, semi-ereta, com ramos de cor verde escura a roxa purpúrea. As folhas são elíptico-acuminadas, denteadas, pubescentes. Foi trazida da Europa no período de colonização do país, sendo muito cultivada como planta medicinal em canteiros de jardins e quintais em todo Brasil. Na região nordeste, somente as plantas cultivadas nas serra úmidas de clima de montanha florescem uma vez por ano. Seu cultivo é feito a partir de pedaços dos ramos subterrâneos, devendo ser replantada a cada seis meses para garantir a boa qualidade da planta⁵¹.

Desde a mais remota antiguidade, esta e outras plantas deste mesmo gênero são utilizadas como condimento de carnes e

massas, bem como para fins medicinais, alimentícios e cosméticos. A literatura etnobotânica registra propriedades espasmolíticas, antivomitivas, carminativas, estomáquicas e anti-helmínticas, por via oral e, antibacterianas, antifúngicas e antiprurido em uso tópico⁵¹. Em pesquisa de Castellucci et al.¹⁸, os dados coletados mostraram que a *Mentha piperita* L. é utilizada para várias doenças como gripes, resfriados, bronquite e tosse. Já estudos *in vitro* registraram importante atividade antimicrobiana e antiviral, forte ação antioxidante, antitumoral e algum potencial antialérgico⁵⁷.

Reações adversas para o chá de *Mentha piperita* L. não foram reportadas na literatura, mas cautela na terapia com óleo essencial para pacientes com refluxo gastrointestinal, hérnia de hiato ou cálculos renais foi recomendada⁵⁷.

O aproveitamento adequado dos princípios ativos de uma planta exige um preparo correto, ou seja, para cada parte da planta a ser usada, grupo de princípio ativo a ser extraído e doença ou sintoma a ser tratado há uma forma de preparo e uso mais adequados⁵⁵.

Tanto na medicina como nas práticas caseiras, as folhas da *Mentha piperita* L. são usadas na forma de chá do tipo abafado (infusão), para os casos de má digestão, náuseas e formação de gases no aparelho digestivo. O chá gelado é um excelente antivomitivo; morno, pode ser usado como gargarejo e bochecho nas inflamações da boca, das gengivas e mesmo de ferimentos, contusões e prurido⁵¹.

A análise fitoquímica das folhas da *Mentha piperita* L. registra como principal componente o óleo essencial extraído das folhas por hidrodestilação, rico na mistura de mentol e mentona, responsável pelo seu agradável odor. Por isso, é empregado para dar sabor e odor a remédios, produtos cosméticos e alimentos⁵¹.

O uso dos óleos essenciais como agente medicinal é conhecido desde a antiguidade. Há registros de seis mil anos atrás, entre

os egípcios, de práticas religiosas e busca de bem estar físico, por meio de aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais, como resinas, folhas, flores e sementes. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, por meio do processo de destilação pelos muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de materiais aromáticos⁸³.

Óleos essenciais são misturas de substâncias orgânicas voláteis, de consistência semelhante ao óleo, definíveis por um conjunto de propriedades, entre as quais se destacam cheiro, sabor e elevada concentração²⁶.

As resinas diferem dos óleos essenciais por conter substâncias tanto voláteis quanto não-voláteis, de alto peso molecular⁵⁵.

Os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores, proteção contra perda de água e aumento da temperatura^{80 e 83}.

Quimicamente, em sua maioria, os óleos essenciais são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos (monoterpenos e sesquiterpenos)^{23 e 83}.

O mentol e a mentona presentes em *Mentha piperita* L. são compostos monoterpênicos que pertencem ao subgrupo dos álcoois (mentol) e das cetonas (mentona)⁸⁶ (Figura 1).

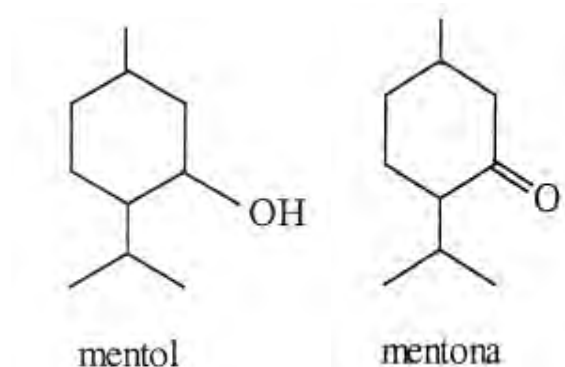


FIGURA 1 – Estrutura química do mentol e mentona extraídos de *Mentha piperita* L.

De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses óleos voláteis em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando esse órgão representa um substrato renovável (resina, folha, flor, fruto, semente), é possível extrair a essência sem eliminar a planta. Isso a torna uma fonte de óleo essencial ecologicamente correta. No entanto, a grande parte dos óleos essenciais mundialmente comercializados é atualmente oriunda de cultivos racionalizados e, sempre que possível, estabilizados genética e climaticamente, o que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto⁸³.

Em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contém maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano. O conhecimento do momento correto da coleta do material desejado leva a obtenção de produtos de melhor qualidade. Geralmente, essa variação ocorre em função do estágio em que se encontra a planta, como na plena floração ou no período que antecede a floração. Para extração de óleos essenciais, as mentas são colhidas quando estão em plena floração. Além disso, de acordo com a substância ativa da planta, existe

horário em que a concentração desses princípios é maior. No período da manhã é recomendada a colheita de plantas com óleos essenciais e alcalóides, e no período da tarde plantas com glicosídeos^{22 e 75}.

2.4 Plantas medicinais e leveduras do gênero *Candida*

Os problemas de segurança, toxicidade e resistência microbiológica, bem como as dificuldades encontradas no tratamento das infecções fúngicas, têm tornado imprescindível o desenvolvimento de novos antifúngicos que apresentem vantagens apreciáveis em relação aos existentes¹⁷. Nesse sentido, tem-se verificado grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis* e *Natural Product Letter*, entre outros¹⁹.

Em relação às leveduras do gênero *Candida*, a investigação da ação de produtos naturais aumentou significativamente nos últimos 10 anos, sendo estudadas mais de 250 espécies de plantas^{1, 15, 24, 28, 29, 41 e 71}.

Hammer et al.⁴¹ usaram o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore de chá) e observaram a inibição reversível da formação do tubo germinativo em *C. albicans*, que é um fator de virulência da levedura. O óleo em altas concentrações inibe totalmente o crescimento do fungo, enquanto baixas concentrações permite somente o crescimento

por brotamento. Os principais efeitos parecem manifestar sobre a membrana celular, provavelmente associado a características lipofílicas dos monoterpenos presentes no óleo^{24 e 89}.

No estudo de Ahmad e Beg¹, 45 extratos etanólicos de plantas medicinais da Índia foram analisados quanto à atividade antimicrobiana, incluindo *C. albicans*. A atividade anticandida foi detectada em 24 extratos, sendo que *Syzygium aromaticum* L. (cravo da Índia) apresentou a maior atividade e, em segundo, *Lawsonia inermis* L. (henna). Quanto à análise fitoquímica, demonstrou-se a presença de fitoconstituintes comuns como flavonóides e fenóis para *Syzygium aromaticum* L. e alcalóides, glicosídeos, taninos e saponinas para *Lawsonia inermis* L.

Pina-Vaz et al.⁷¹ avaliaram a atividade anticandida do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho), *T. zygis* e *T. mastichina* e observaram que o óleo essencial de *T. vulgaris* e *T. zygis*, bem como os seus principais componentes (carvacrol, timol e p-cimene) demonstraram uma importante atividade antifúngica. Carvacrol e p-cimene foram os componentes mais ativos, o que explica a forte atividade de *T. vulgaris* e *T. zygis* em comparação com *T. mastichina*, já que esta não possui esses componentes.

Bonjar¹⁵ avaliou a atividade anticandida dos extratos metanólicos de quarenta e duas espécies de plantas usadas na medicina popular do Irã contra *C. albicans* resistente ao clotrimazol. Das plantas estudadas, dezenove espécies apresentaram atividade anticandida, sendo as mais ativas *Terminalia chebula* e *Thymus vulgaris* (tomilho).

Dulger et al.²⁹ estudaram a atividade anticandida dos extratos metanólicos de sete espécies de *Sideritis* contra *C. albicans* resistente ao clotrimazol. As plantas mais ativas foram *S. trojana* e *S. bilgerana*.

Muitos estudos também têm sido feitos em relação à atividade anticandida da planta *Mentha piperita* L., utilizando óleo essencial ou extratos da planta^{14, 28, 31, 68, 81 e 89}.

Pattnaik et al.⁶⁸ demonstraram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Mentha piperita* L. em onze dos doze fungos testados, incluindo *C. albicans* (amostra clínica), que obteve a concentração inibitória mínima (CIM) de 5,0 µL/mL utilizando o método da diluição em ágar. No teste de difusão em disco, o óleo essencial de *Mentha piperita* L. inibiu o crescimento de *C. albicans*.

Blaszczyk et al.¹⁴ pesquisaram extratos de cinquenta e seis plantas medicinais chinesas quanto às suas propriedades antimicóticas, sendo que o extrato de *Mentha piperita* L. apresentou moderada atividade antimicótica contra *C. albicans* (amostra clínica), com halo de inibição igual a 2,0 cm após dois dias e 1,5 cm após três e quatro dias. Já Ezzat³¹ mostrou que o óleo de *Mentha piperita* L. apresentou uma forte atividade contra *C. albicans* (ATCC 10261), com halo de inibição igual a 5,0 cm após três dias de incubação.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L. para *C. albicans* (ATCC 10231) foi averiguada inicialmente por meio de teste bioautográfico e subsequente determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em trabalho de Sartoratto et al.⁸¹. A análise bioautográfica permite a identificação das frações ativas dos óleos essenciais e, como resultado, foi obtido o linalol como principal constituinte do óleo essencial de *Mentha piperita* L. O óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresentou moderada atividade contra *C. albicans* com valor de concentração inibitória mínima igual a 0,74 mg/mL.

Em estudo de Duarte et al.²⁸ os óleos essenciais e extratos etanólicos de plantas comumente usadas no Brasil foram pesquisados quanto à atividade anticandida. Os óleos essenciais de treze plantas, incluindo *Mentha piperita* L., apresentaram atividade anticandida,

enquanto os extratos etanólicos não foram efetivos em nenhuma das concentrações testadas. As análises químicas mostraram a presença de compostos com conhecida atividade antimicrobiana como linalol e mentol.

Tampieri et al.⁸⁹ avaliaram a atividade inibitória *in vitro* de alguns óleos essenciais, incluindo *Mentha piperita* L. e seus principais constituintes contra uma cepa de *C. albicans*. O óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresentou uma forte atividade inibitória (CIM = 500 ppm).

3 PROPOSIÇÃO

Esse estudo teve como objetivos:

- a) avaliar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Mentha piperita* L. sobre isolados clínicos de *Candida* spp.;
- b) observar o efeito da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de leveduras do gênero *Candida* à resina acrílica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sob o protocolo nº 08/2007-PH/CEP (Anexo A).

4.1 Coleta de *Mentha piperita* L.

Mentha piperita L. (Figura 2) foi coletada no horto medicinal do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté (UNITAU), entre 9 e 10 horas da manhã, em período de uma semana sem chuvas. As datas das coletas foram: 18/01/2006 para o preparo do extrato hidroalcoólico, 15/05/2006 para o preparo do óleo essencial e 04/12/2006 para o preparo da infusão. Após a coleta, as plantas foram lavadas, para remoção de impurezas como terra e insetos. A seguir, foi feita a secagem das plantas à temperatura ambiente e retirada das folhas.



FIGURA 2 – *Mentha piperita* L. do horto medicinal do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade de Taubaté (UNITAU)

4.2 Preparo do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

O preparo do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. foi baseado na metodologia descrita por Martins et al.⁵⁵. Foi utilizada a proporção de 50% em peso de planta fresca em relação ao etanol 99,3°GL em volume, ou seja, 500 g da planta fresca (somente folhas) em 1L de etanol 99,3°GL.

Após a pesagem, as folhas foram transferidas para frasco âmbar, devidamente identificado e a seguir, foi acrescentado etanol 99,3°GL. O frasco foi acondicionado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, procedendo-se a maceração por quinze dias, com agitação duas vezes ao dia durante 60 segundos, para assegurar a adequada extração dos princípios ativos.

Finalmente, o extrato foi submetido à filtração em papel de filtro quantitativo (0,00009 g, Framex) e o produto resultante, denominado

extrato hidroalcoólico, foi transferido para um frasco de vidro âmbar. O extrato hidroalcoólico obtido foi analisado quanto ao teor alcoólico, com auxílio de alcoômetro, obtendo-se o valor de 79°GL. Em seguida, foi preparado o controle, o etanol 79°GL, também com auxílio do alcoômetro.

O extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e o controle (etanol 79°GL) foram esterilizados por filtração em membrana de éster celulose 0,22 µm (Millipore) e imediatamente utilizados nos testes.

4.3 Extração do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, técnica utilizada por Pereira et al.⁷⁰. Em um balão volumétrico com capacidade para 500 mL foram colocados 100 g de folhas frescas de *Mentha piperita* L. e 250 mL de água. Esse conjunto foi aquecido por um bico de Bunsen e obteve-se a geração de correntes de vapor de água que foram conduzidas a um condensador de serpentina de 75 cm. O óleo essencial foi separado da água com auxílio de funil separador de 500 mL.

4.4 Preparo da infusão de *Mentha piperita* L.

Para o preparo da infusão foram utilizadas 10% de folhas frescas de *Mentha piperita* L. A infusão foi obtida por fervura da água necessária, que foi vertida sobre as folhas de *Mentha piperita* L. previamente pesadas e cortadas, colocadas em outro recipiente. Após a mistura, o recipiente permaneceu tampado por um período de 10 minutos.

A seguir, a infusão foi filtrada em papel de filtro quantitativo (0,00009 g, Framex) e esterilizada por filtração em membrana de éster celulose de 0,22 µm (Millipore), sendo imediatamente utilizada nos testes.

4.5 Leveduras do gênero *Candida*

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de *Mentha piperita* L. foi avaliada em 80 cepas de leveduras do gênero *Candida*, sendo cinquenta *C. albicans*, 10 *C. glabrata*, 10 *C. tropicalis*, 8 *C. parapsilosis* e 2 *C. krusei*. Essas cepas foram provenientes do laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, obtidas a partir de amostras de saliva coletadas da cavidade bucal humana. As amostras de *C. albicans* foram isoladas de indivíduos saudáveis e as amostras das outras espécies de *Candida* foram isoladas de indivíduos com fatores predisponentes à candidose bucal como antibioticoterapia prolongada, infecção pelo HIV e radioterapia.

A partir de cada cepa de *Candida* analisada, foi preparada uma suspensão contendo 10^6 células viáveis/mL. Para obtenção desta suspensão, a cepa foi semeada em ágar Sabouraud dextrose (Oxoid Brasil Ltda) e incubada a 37°C por 24 horas. O crescimento foi suspenso em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%). A concentração da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Micronal, B-582) com comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284.

4.6 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

Foram determinadas a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico sobre oitenta cepas de *Candida*.

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. foi utilizado o método de diluição em caldo.

Diluições seriadas do extrato hidroalcoólico foram preparadas em tubos contendo caldo Sabouraud, de forma a representarem 1/2 (250 mg/mL), 1/4 (125 mg/mL), 1/8 (62,5 mg/mL), 1/16 (31,25 mg/mL), 1/32 (15,62 mg/mL), 1/64 (7,81 mg/mL) e 1/128 (3,9 mg/mL) da concentração original (Figura 3). A seguir, foram acrescentados 100 µL da suspensão padronizada (10^6 células viáveis/mL) de cada cepa de *Candida* testada. Os testes foram realizados em duplicata. O grupo controle foi constituído de caldo Sabouraud e etanol 79°GL nas mesmas diluições do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. Após incubação por 24 horas a 37°C, a leitura foi realizada por observação visual da turvação do meio. Foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração do extrato hidroalcoólico testado, capaz de inibir o crescimento microbiano em caldo.

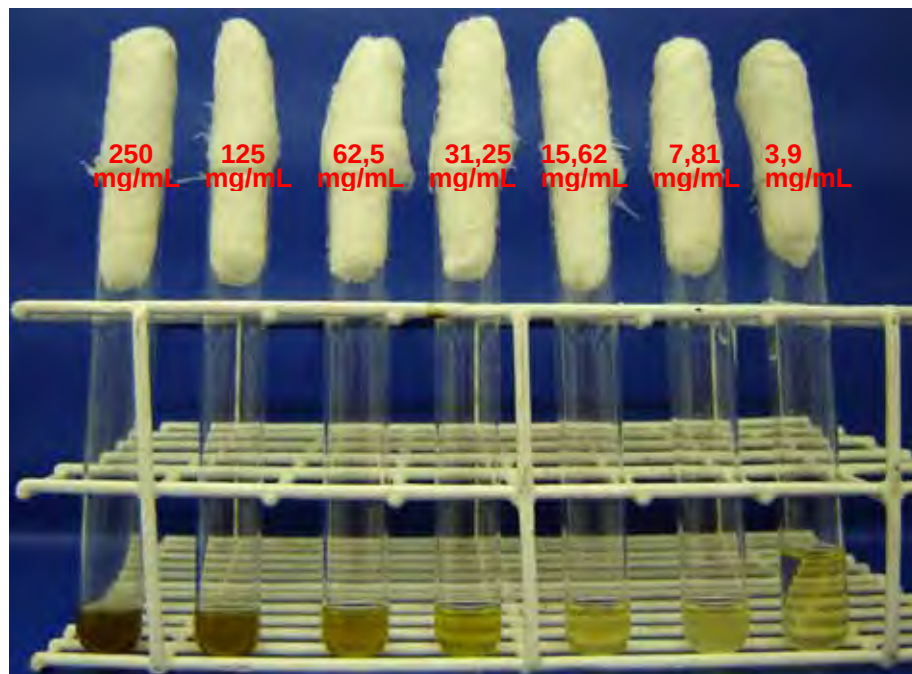


FIGURA 3 – Diluições seriadas do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

4.6.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

Três inóculos do teste anterior que não apresentaram crescimento em caldo foram semeados em placas contendo ágar Sabouraud dextrose para determinação da concentração fungicida mínima. Para isso, 100 μ L do inóculo foram semeados em ágar Sabouraud dextrose utilizando-se alça Drigalski. Após período de incubação de 48 horas a 37°C, foi verificado crescimento de colônias características do gênero *Candida*. Foi considerada concentração fungicida mínima (CFM) como sendo a menor concentração do extrato hidroalcoólico testado capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano em meio de cultura sólido em placas.

4.7 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Para determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L. foi realizado o teste da difusão em ágar. Suspensão de *Candida* preparada conforme descrito no item 4.5 foi inoculada por técnica de *pour plate* em placas de Petri (90 X 15 mm) contendo ágar Sabouraud dextrose, utilizando-se a proporção de 1:200. O óleo essencial de *Mentha piperita* L. e as substâncias controles foram aplicados com auxílio do replicador de Steers (Figura 4). Como controle positivo de crescimento foi utilizado cloranfenicol (União Química Farmacêutica Nacional S/A, 0,1 mg/mL) e controle negativo de crescimento foi utilizado nistatina (EMS S/A, 100.000 UI/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi feita a leitura observando-se a formação de uma área de inibição no local de aplicação do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

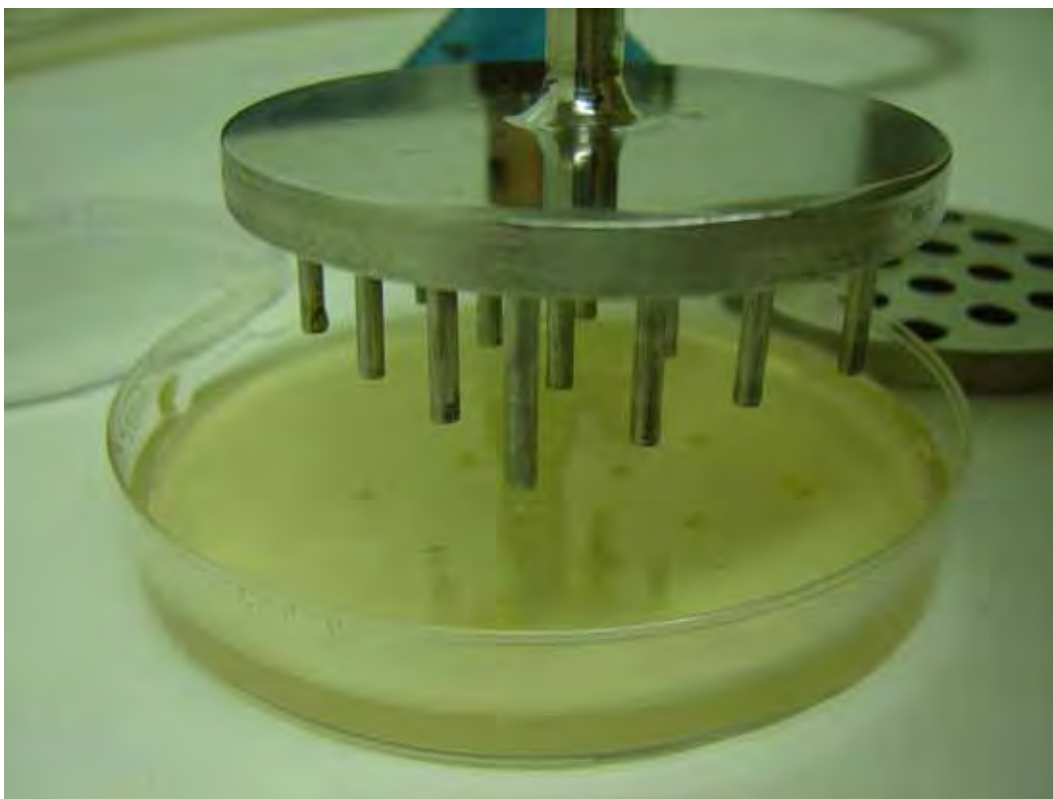


FIGURA 4 – Aplicação do óleo essencial de *Mentha piperita* L. e dos controles negativo (cloranfenicol) e positivo (nistatina) com o replicador de Steers.

Para evidenciar o halo de inibição formado, foi adicionado sobre a superfície da placa após incubação a 37°C por 24 horas, com auxílio de uma proveta, 5 mL de solução contendo 0,1% de cloreto de trifênil tetrazolium (Vetec Química Fina Ltda) e 1% ágar, previamente autoclavada a 121°C por 15 minutos (Figura 5).



FIGURA 5 – Adição da solução 0,1% de cloreto de trifênil tetrazolium e 1% de ágar

4.8 Avaliação dos efeitos da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica

Os efeitos da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica foram testados em cepas padrão de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC 6258).

Foram confeccionados cento e vinte corpos de prova de resina acrílica ativada quimicamente incolor (Clássico - Produtos Odontológicos Ind. Ltda) com 5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura, utilizando-se matriz metálica (Figura 6). Os corpos de prova foram colocados em recipientes de vidro contendo solução fisiológica e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuídos conforme os grupos experimentais descritos no Quadro 1.

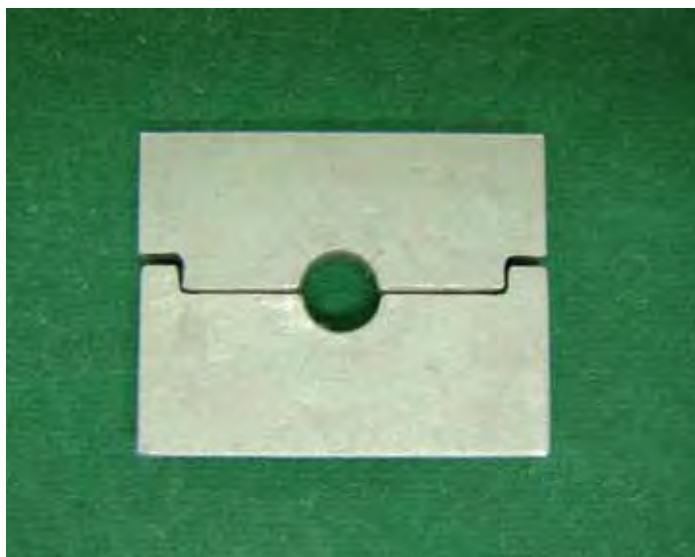


FIGURA 6 – Matriz metálica utilizada para confecção dos corpos de prova de resina acrílica.

Quadro 1 – Número de corpos de prova distribuídos nos diferentes grupos experimentais

Espécie	Infusão de <i>Mentha piperita</i> L.	Controle (Água destilada)
<i>C. albicans</i>	15	15
<i>C. glabrata</i>	15	15
<i>C. tropicalis</i>	15	15
<i>C. krusei</i>	15	15

Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), os corpos de prova foram colocados em placas de cultura de células de 24 poços (Costar Coming, New York, EUA), sendo uma placa para cada grupo experimental (n=15). Em cada poço foi acrescentado 1 mL do caldo Sabouraud, 1 mL da infusão de *Mentha piperita* L. ou água destilada (controle) e 100 µL da suspensão de *Candida* (10^6 células viáveis/mL) previamente preparada. As placas foram fechadas e mantidas a 37°C por 24 horas.

A seguir, os corpos de prova foram removidos, lavados com 1mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e pérolas de vidro, sendo o conjunto agitado em um agitador de tubos por 60 segundos. Leveduras que se aderiram aos corpos de prova foram dispersas, diluídas dez e cem vezes e transferidas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose. Após 48 horas de incubação a 37°C foi determinado o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para cada espécime.

4.9 Análise estatística

Os valores de UFC/mL obtidos na avaliação dos efeitos da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica, foram transformados em logaritmo (Log) e submetidos ao teste *t* de *Student* com nível de significância de 5% (Programa Minitab).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

5.1.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. foi de 31,25 mg/mL para 82% das cepas de *C. albicans* e 70% das cepas de *C. tropicalis*, 62,5 mg/mL para 80% das cepas de *C. glabrata* e 100% das cepas de *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Já em relação ao grupo controle, a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 31,25 mg/mL para apenas 50% das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, enquanto que para as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* foi 62,5 mg/mL para 100% das cepas.

O resultado de amostras de *Candida* inibidas pelo extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e pelo controle, em relação à CIM, estão representados na Tabela 1. A Figura 7A mostra os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L., enquanto a Figura 7B mostra os resultados da concentração inibitória mínima para o controle.

Tabela 1 – Porcentagem de inibição de amostras de *Candida* em relação à CIM do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle

Amostras de		Concentração do Extrato (mg/mL)						
<i>Candida</i>		250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90
<i>C. albicans</i>	E	100	100	100	82	0	0	0
(n = 50)	C	100	100	96	50	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	E	100	100	100	90	20	0	0
(n = 10)	C	100	100	100	70	20	0	0
<i>C. glabrata</i>	E	100	100	100	20	0	0	0
(n = 10)	C	100	100	100	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	E	100	100	100	0	0	0	0
(n = 8)	C	100	100	100	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	E	100	100	100	0	0	0	0
(n = 2)	C	100	100	100	0	0	0	0

E: extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

C: controle

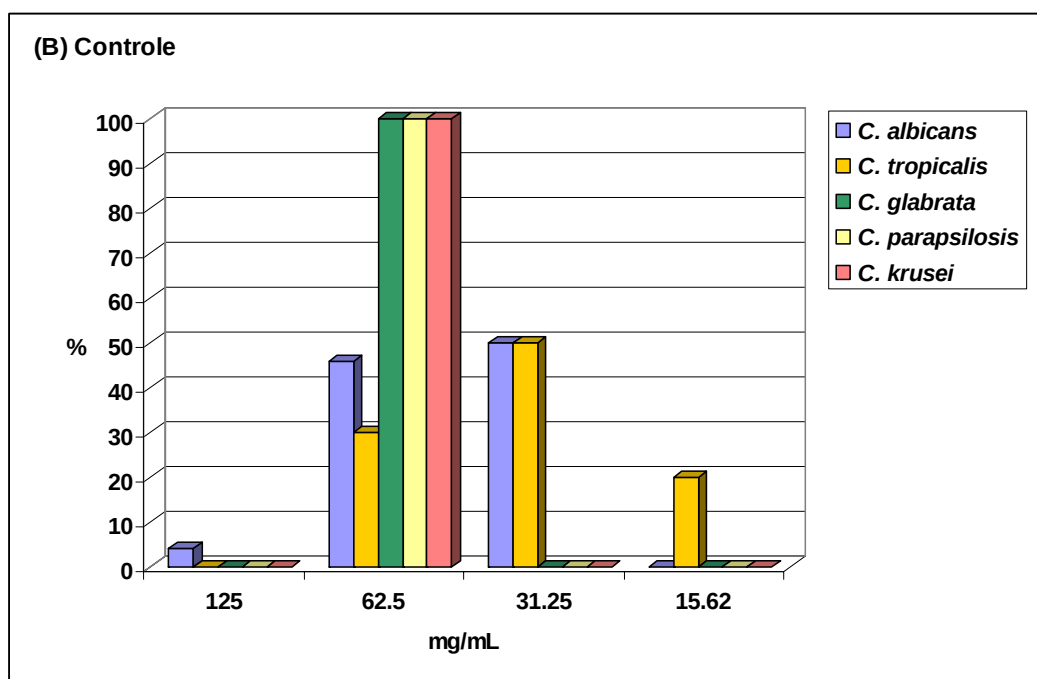
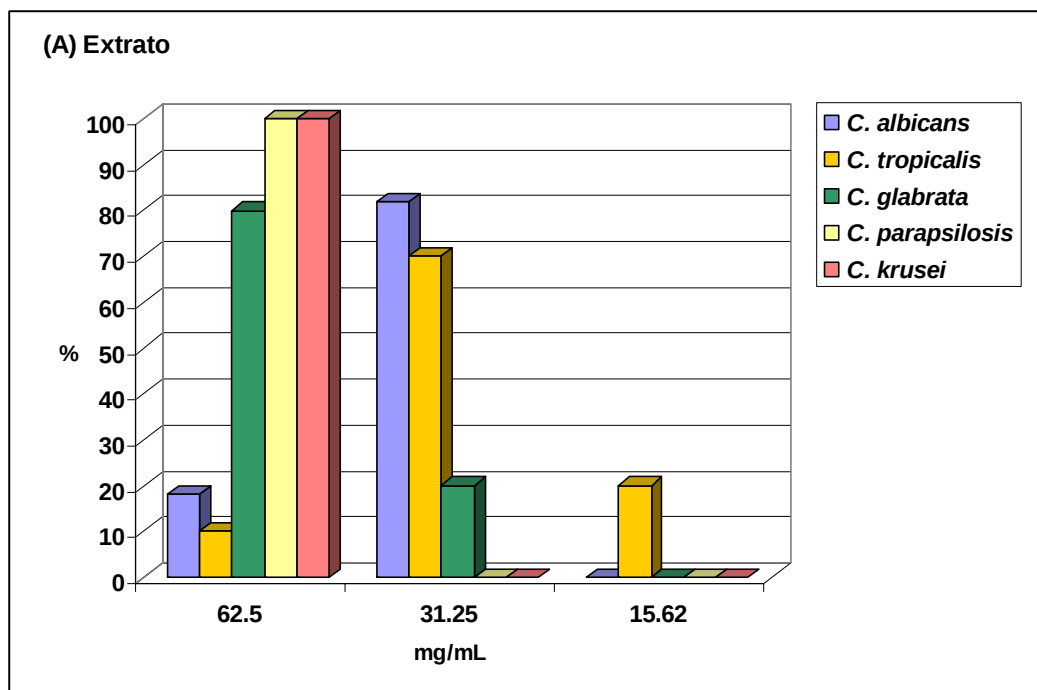


FIGURA 7 - Concentração inibitória mínima (CIM): a) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.; b) controle.

Comparando a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. com o grupo controle, observa-se que para as espécies *C. parapsilosis* e *C. krusei*, 100% das amostras apresentaram concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico igual à concentração inibitória mínima do grupo controle. Esses dados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Porcentagem de amostras de *Candida* em relação à concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. menor e igual à concentração inibitória mínima (CIM) do grupo controle

Espécies	CIM	CIM
	Extrato < Controle	Extrato = Controle
<i>C. albicans</i> (n=50)	34	66
<i>C. tropicalis</i> (n=10)	20	80
<i>C. glabrata</i> (n=10)	20	80
<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	0	100
<i>C. krusei</i> (n=2)	0	100

5.1.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

A concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. foi de 62,5 mg/mL para 68% das cepas de *C. albicans*, 60% das cepas de *C. tropicalis* e 50% das cepas de *C. glabrata*, 125 mg/mL para 87,5% das cepas de *C. parapsilosis* e 100% das cepas de *C. krusei*. Já em relação ao grupo controle, a concentração

fungicida mínima (CFM) foi de 125 mg/mL para 70% das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, 90% das cepas de *C. tropicalis* e 87,5% das cepas de *C. parapsilosis* e 250 mg/mL para 100% das amostras de *C. krusei*.

O resultado de amostras de *Candida* inibidas pelo extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e pelo controle, em relação à CFM, estão representados na Tabela 3. A Figura 8A mostra os resultados da concentração fungicida mínima (CFM) para o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L., enquanto a Figura 8B mostra os resultados da concentração fungicida mínima (CFM) para o controle.

Tabela 3 - Porcentagem de inibição de amostras de *Candida* em relação à CFM do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle

Amostras de		Concentração do Extrato (mg/mL)						
<i>Candida</i>		250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90
<i>C. albicans</i>	E	100	100	68	0	0	0	0
	(n = 50)	C	100	96	26	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	E	100	100	60	0	0	0	0
	(n = 10)	C	100	90	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	E	100	100	50	0	0	0	0
	(n = 10)	C	100	90	20	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	E	100	100	12,5	0	0	0	0
	(n = 8)	C	100	87,5	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	E	100	100	0	0	0	0	0
	(n = 2)	C	100	0	0	0	0	0

E: extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

C: controle

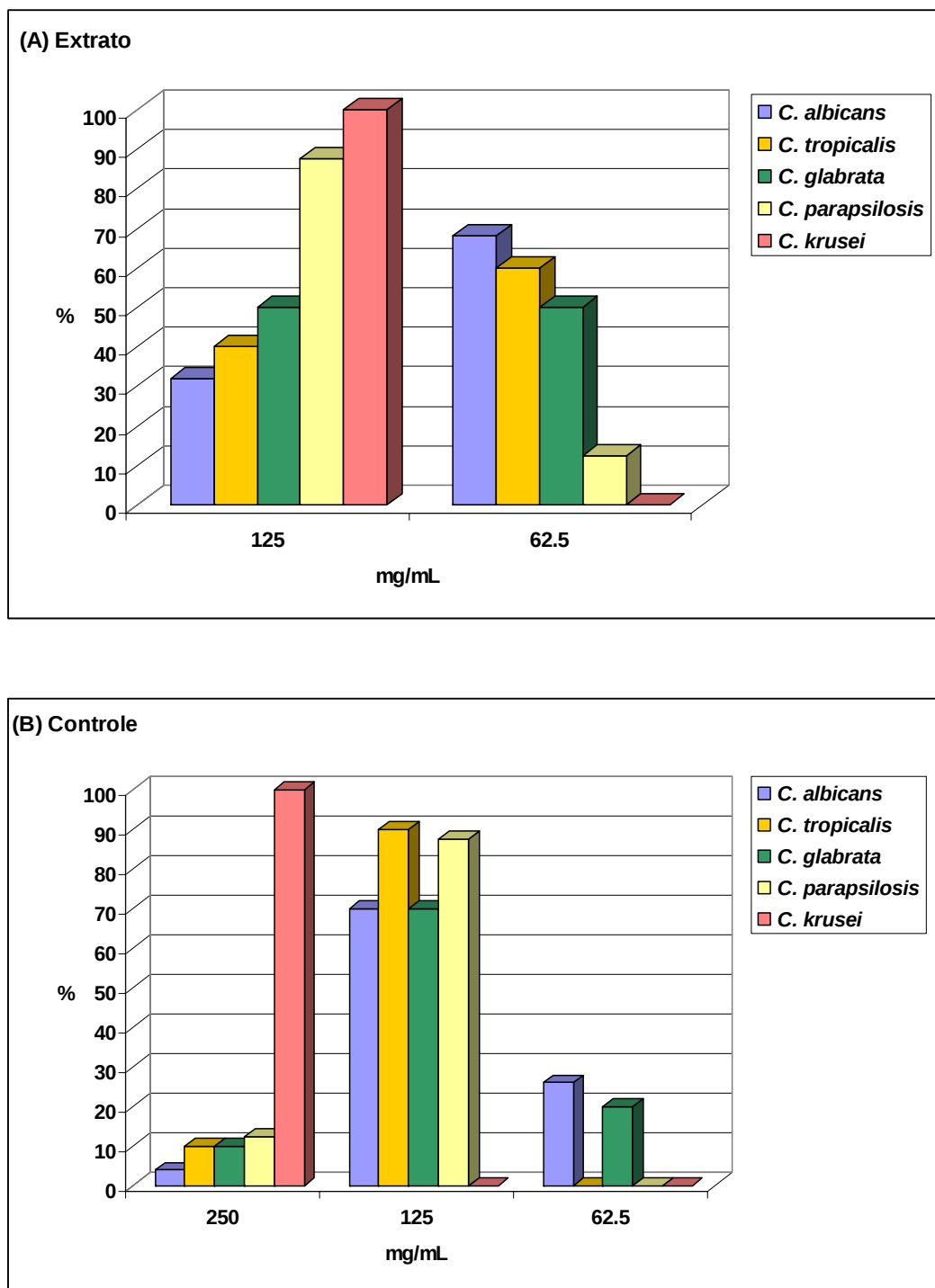


FIGURA 8 – Concentração fungicida mínima (CFM): a) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.; b) controle.

Na concentração fungicida mínima (CFM), a comparação entre o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e o grupo controle mostra que para 100% das amostras de *C. krusei* e 60% das amostras de *C. tropicalis* a concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico foi menor que a concentração fungicida mínima (CFM) do grupo controle. Esses dados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Porcentagem de amostras de *Candida* em relação à concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. menor e igual à concentração fungicida mínima (CFM) do grupo Controle

Espécies	CFM	CFM
	Extrato < Controle	Extrato = Controle
<i>C. albicans</i>	44	56
<i>C. tropicalis</i>	60	40
<i>C. glabrata</i>	40	60
<i>C. parapsilosis</i>	25	75
<i>C. krusei</i>	100	0

A Figura 9 ilustra o resultado da concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para uma cepa de *C. tropicalis*.

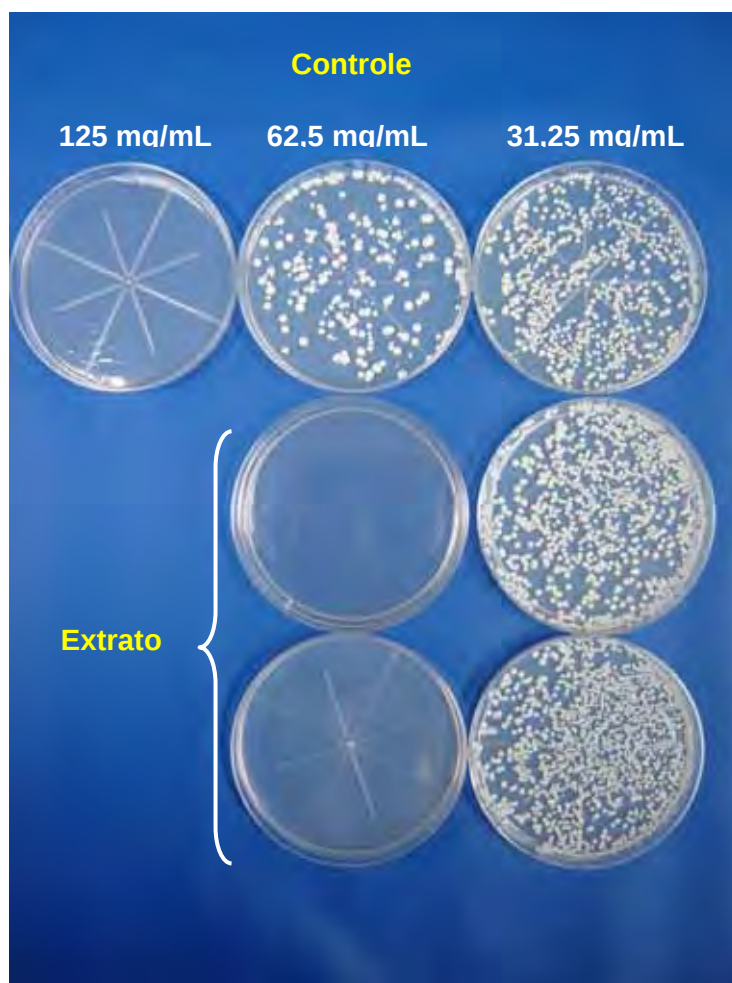


FIGURA 9 – Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do controle para uma cepa de *C. tropicalis*.

5.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Entre as oitenta cepas de *Candida* analisadas neste trabalho, o óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresentou atividade inibitória sobre trinta e nove cepas (48,75%) com halos de inibição variando entre 5 a 10 mm. Das espécies estudadas, *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial de *Mentha*

piperita L., sendo 68% das amostras inibidas pela presença do óleo. Esses dados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Sensibilidade das amostras de *Candida* ao óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Espécies	Nº cepas inibidas	%
<i>C. albicans</i> (n=50)	34	68
<i>C. tropicalis</i> (n=10)	4	40
<i>C. parapsilosis</i> (n=8)	1	12,5
<i>C. glabrata</i> (n=10)	0	0
<i>C. krusei</i> (n=2)	0	0
Total (n=80)	39	48,75

A Figura 10 mostra o resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L., do controle negativo (nistatina) e do controle positivo (cloranfenicol) para uma cepa de *C. albicans*.

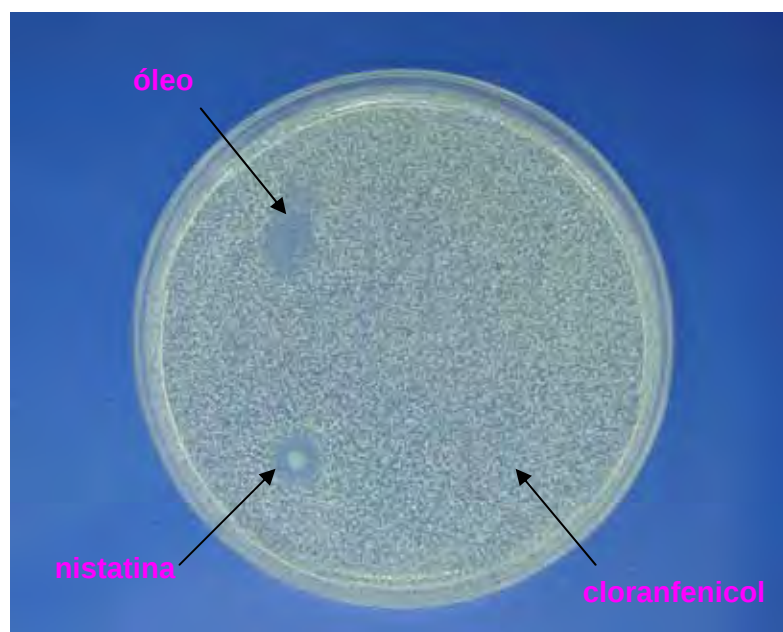


FIGURA 10 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L., controle negativo (nistatina) e controle positivo (cloranfenicol) para uma cepa de *C. albicans*.

A Figura 11 mostra o resultado observado após a adição do revelador cloreto de trifetil tetrazolium 0,1% na superfície da placa após incubação a 37°C por 24 horas, evidenciando o halo de inibição do crescimento dos microrganismos.

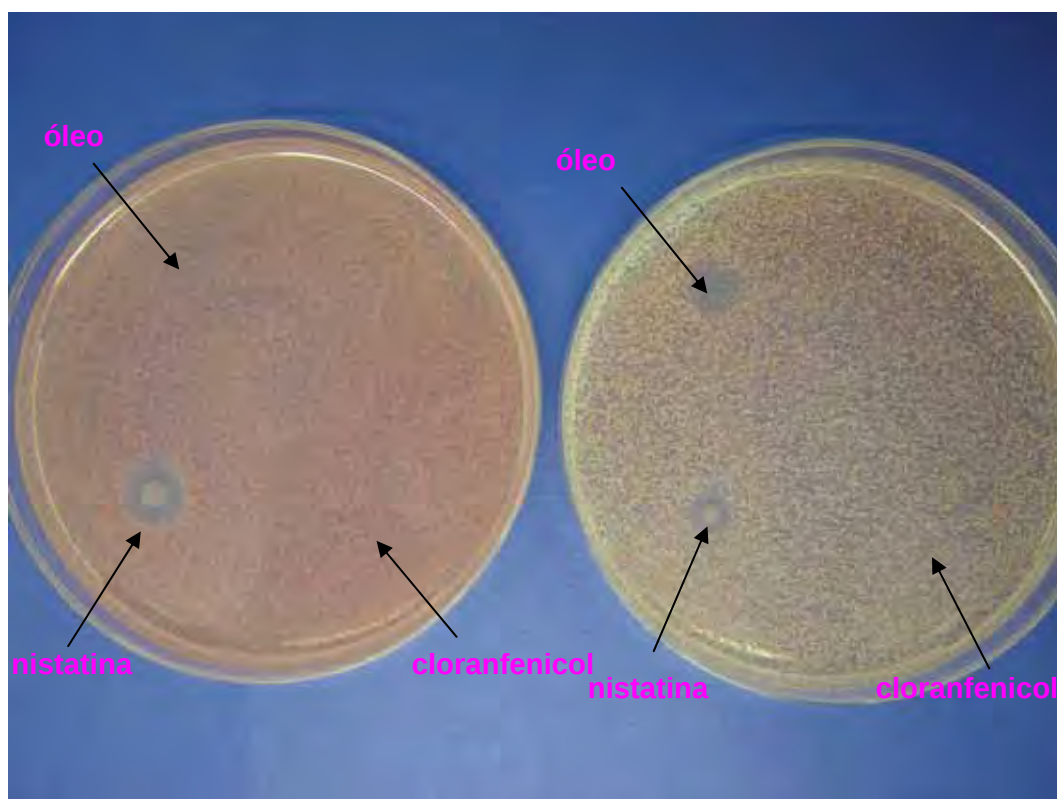


FIGURA 11 – Resultado obtido após adição do revelador cloreto de trifetil tetrazolium 0,1%

5.3 Avaliação dos efeitos da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica

As médias de UFC/mL (Log) de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram semelhantes entre os grupos infusão e controle, não havendo diferença estatisticamente significante entre elas. As médias e os desvios-padrão obtidos nos testes de aderência de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Médias e Desvio-padrão dos dados de UFC/mL (Log) obtidos nos testes de aderência das diferentes espécies de *Candida* à resina acrílica

Amostras	Grupos	Médias	Desvio-padrão	p*
<i>C. albicans</i>	Infusão	4,41	0,21	0,088
	Controle	4,24	0,28	
<i>C. glabrata</i>	Infusão	4,42	0,18	0,45
	Controle	4,36	0,22	
<i>C. tropicalis</i>	Infusão	4,3	0,21	0,39
	Controle	4,22	0,24	
<i>C. krusei</i>	Infusão	4,38	0,18	0,067
	Controle	4,24	0,22	

* Teste *t* de *Student*: não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos infusão e controle para todas as espécies de *Candida* estudadas.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar se o extrato hidroalcoólico, a infusão e o óleo essencial de *Mentha piperita* L. possuem atividade inibitória sobre leveduras do gênero *Candida*.

6.1 Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L.

O extrato hidroalcoólico é a maneira mais simples de conservar por longo período os princípios ativos de plantas medicinais, pois as substâncias ativas, em sua maioria, são solúveis em álcool⁵⁵. Um dos principais processos para obtenção de extrato hidroalcoólico é a maceração. O método de maceração consiste em deixar a planta ou animal em contato com o veículo extrator adequado, com agitação, por certo período de tempo. Trata-se de um processo de extração em que os principais fenômenos envolvidos são a difusão e a osmose³³.

As plantas medicinais, que têm avaliadas a sua eficiência terapêutica, toxicologia e segurança de uso, dentre outros aspectos, estão cientificamente aprovadas a serem utilizadas pela população nas suas necessidades básicas de saúde, em função da facilidade de acesso, do baixo custo e da compatibilidade cultural com as tradições populares. Uma vez que as plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, a lei permite que sejam comercializadas e cultivadas⁵⁵. Assim, a utilização de plantas medicinais por meio de uma metodologia de preparo

acessível, como a utilizada nesse trabalho, para casos considerados mais simples e corriqueiros, pode facilitar e reduzir o custo do serviço de saúde pública.

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas, que podem causar infecções locais ou sistêmicas em indivíduos com fatores predisponentes, como portadores de próteses dentárias, diabetes e comprometimentos do sistema imunológico. A alta incidência de infecções fúngicas em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos devido ao tratamento prolongado com esses medicamentos têm estimulado os pesquisadores a buscarem terapias alternativas para o tratamento da candidose, como a fitoterapia^{36 e 28}. Além disso, produtos odontológicos contendo substâncias naturais apresentam boas perspectivas comerciais, devido à aceitação popular da fitoterapia, e poderiam ser introduzidos desde que amparados em estudos laboratoriais e clínicos específicos³⁴.

Várias plantas medicinais têm sido estudadas para o tratamento da candidose, incluindo *Mentha piperita* L. No presente estudo, o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. apresentou valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 15,62 mg/mL a 62 mg/mL para as amostras de *Candida* testadas. No trabalho de Ertürk³⁰, o extrato etanólico de *Mentha piperita* apresentou forte atividade antifúngica para *C. albicans* (ATCC 60192) com halos de inibição de 18-23 mm/15 µL de extrato após 48 horas de incubação e a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *Mentha piperita* L. para *C. albicans* foi 5 mg/mL.

Mardegan et al.⁵⁴ avaliaram o extrato (planta seca extraída por diclorometano) de *Mentha piperita* L. e encontraram valores de CIM que variaram de 0,25 mg/mL a 1,75 mg/mL para as espécies de *Candida* isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e da coleção do

centro de pesquisa da UNICAMP. Como controle e para efeito comparativo foi utilizado o fluconazol. Somente duas cepas foram sensíveis ao fluconazol, e as demais classificadas como intermediárias e ou resistentes.

O extrato (feito em água, em seguida evaporado e dissolvido em etilacetato) de *Mentha piperita* L. apresentou atividade moderada para *C. albicans*, com halo de inibição igual a 2,0 cm após 2 dias e 1,5 cm após 3 e 4 dias¹⁴. Em outro estudo, o extrato aquoso de *Mentha piperita* L. foi testado em *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium culmorum* e obteve-se na concentração de 1,5 g/mL 100% de inibição no crescimento de *Fusarium culmorum*, 50% de inibição no crescimento de *Aspergillus candidus* e *Penicillium* sp. e abaixo de 50% de inibição no crescimento *Aspergillus niger*⁵². Provavelmente, a discordância entre os valores de CIM do presente trabalho com os demais estudos, pode ser atribuída aos diferentes modos de extração da planta, metodologias de CIM e sensibilidades das cepas de *Candida*.

Neste trabalho e na maioria dos estudos encontrados na literatura observa-se atividade inibitória de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida* e outros fungos. Entretanto, Duarte et al.²⁸ verificaram que o extrato etanólico de *Mentha piperita* L. não foi efetivo em nenhuma das concentrações testadas para cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 10231) estudada.

Além de *Mentha piperita* L, outras plantas medicinais têm apresentado atividade antimicrobiana sobre leveduras do gênero *Candida*: *Thymus vulgaris* (tomilho)^{28 e 71}, *Terminalia chebula*¹⁵, *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia)¹, *Cymbopogon winterianus* (citronela)²⁸ e *Annona crassiflora* (araticum)⁸⁵.

Silva et al.⁸⁵ investigaram o extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* (araticum) em cinquenta e duas cepas de *C. albicans*, quatro cepas de *C. tropicalis* e três cepas de *C. krusei*, isoladas de

indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com candidose orofaríngea, utilizando-se o método da diluição em ágar⁸⁵. Foi observado que 18,6% das cepas apresentaram CIM igual a 0,5 µg/ml e 17% das cepas apresentaram CIM igual a 2,00 µg/mL. Já em estudo de Agripino et al.² nenhum extrato de oitenta e oito espécies nativas do estado de São Paulo coletadas numa região de Mata Atlântica, apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans*.

No presente estudo, foram analisadas oitenta amostras clínicas de *Candida* isoladas da cavidade bucal humana, pertencentes a cinco espécies diferentes. O extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. apresentou atividade fungistática para *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Observou-se que a CIM do extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. foi inferior ao grupo controle em 34% das cepas de *C. albicans*, 20% das cepas de *C. tropicalis* e 20% das cepas de *C. glabrata*. Entretanto, não foi encontrada atividade fungistática dessa planta para *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

No estudo de Silva et al.⁸⁵, o extrato etanólico de *Annona crassiflora* (araticum) apresentou atividade fungistática sobre as 3 espécies estudadas, sendo que as cepas de *C. tropicalis* foram mais sensíveis ao extrato etanólico dessa planta do que as cepas de *C. krusei* e *C. albicans*. Por outro lado, no presente trabalho não foi observada atividade fungistática para *C. krusei*, apenas atividade fungicida. A diferença observada nos resultados desses trabalhos pode ser atribuída à sensibilidade das cepas isoladas e também ao número reduzido de amostras de *C. krusei* analisadas (3 cepas no trabalho de Silva et al.⁸⁵ e 2 cepas no presente trabalho). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos mais detalhados para investigar as propriedades antimicrobianas de diferentes plantas medicinais sobre as várias espécies do gênero *Candida*, principalmente em amostras clínicas

isoladas de pacientes saudáveis e com fatores predisponentes para a candidose.

6.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

No presente estudo, o óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresentou 48,75% de inibição para as amostras testadas, sendo que *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior sensibilidade ao óleo (68%) seguida por *C. tropicalis* (40%). Pereira et al.⁷⁰ utilizando a mesma metodologia, observaram atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de *Salvia officinalis* L. (sálvia), que apresentou em média 79% de inibição sobre cepas de Enterobactérias isoladas de infecção urinária.

É difícil comparar nossos resultados com os da literatura devido à variação natural da composição dos óleos essenciais, mesmo entre espécies iguais, em decorrência de colheitas em épocas diferentes, variações climáticas, métodos de extração diferentes, entre outros. Além disso, parece ter também importância os diferentes testes microbiológicos utilizados e as diferentes sensibilidades das cepas⁸⁹.

Em geral, a eficácia das plantas medicinais tem sido avaliada por comparação com antibióticos. Ainda não foram estabelecidos valores aceitáveis de ação antimicrobiana para essas referidas plantas. Sendo assim, Aligiannis et al.⁴ fizeram uma classificação para plantas medicinais baseada no resultado da concentração inibitória mínima (CIM), sendo considerados inibidores fortes com CIM até 0,5 mg/mL; inibidores moderados com CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL e inibidores fracos com CIM acima de 1,6 mg/mL.

Em pesquisa de Duarte et al.²⁸ observa-se que *Mentha arvensis* e *Mentha piperita* L. apresentaram atividade moderada contra *C.*

albicans (ATCC 10231), com CIM de 1,1 mg/mL e 0,6 mg/mL, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com estudo de Sartoratto et al.⁸¹, no qual *Aloysia triphylla* e *Mentha piperita* L. exibiram atividade moderada contra *C. albicans* (ATCC 10231), com CIM de 0,80 mg/mL e 0,74 mg/mL, respectivamente.

Iskan et al.⁴² avaliaram 4 óleos essenciais de *Mentha piperita* L. de procedências diferentes, o mentol e a mentona contra *C. albicans* (amostra clínica). Obteve-se os valores de CIM de 0,625 mg/mL para o mentol, de 0,312 a 0,625 mg/mL para os óleos. A mentona mostrou-se menos ativa (CIM = 2,5 mg/mL) que o mentol contra *C. albicans*. Os principais componentes do óleo identificados foram mentol (28-42%) e mentona (18-28%).

Na investigação de 3 tipos de óleos essenciais de *Mentha suaveolens*, Oumzil et al.⁶⁶ observaram que o óleo essencial rico em pulegona (50%) foi o mais ativo contra *C. albicans* (duas amostras) e *C. glabrata* (uma amostra), com valores de CIM entre 0,34 e 0,69 ppm. Quando comparados os resultados de CIM para pulegona e mentona, observa-se que o constituinte pulegona é muito mais ativo (valores de CIM entre 0,69 e 1,38 ppm) que a mentona (CIM igual a 11,11 ppm).

O óleo de *Mentha piperita* L. usado no trabalho de Yadegarinia et al.⁹⁴ teve ação fungicida até a diluição 1/4 (2 µL/mL) contra *C. albicans* enquanto Mímica-Dukic et al.⁶⁰ obtiveram até 8 µL/mL e Hammer et al.⁴⁰ obteve até 0,25% (v/v) que equivale a 25 µL/mL para *C. albicans*. O óleo de *Mentha piperita* L. também teve ação fungicida para *C. albicans* na proporção de 500 ppm em estudo de Tampieri et al.⁸⁹ e apresentou uma forte atividade contra *C. albicans* (ATCC 10261) no trabalho de Ezzat³¹.

Os óleos essenciais de plantas e seus constituintes podem ser utilizados como agentes antifúngicos no controle da deterioração dos alimentos pela presença de leveduras. O óleo essencial

de *Mentha piperita* L. foi avaliado quanto a sua ação antifúngica contra as leveduras *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens*, *Dekkera anomala* e *Yarrowia lipolytica*, sendo mais ativo contra *Pichia membranifaciens* e *Dekkera anomala*, com valores de CIM iguais a 500 µg/mL⁷.

Em relação à composição química dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L., o mentol tem sido considerado responsável pela ação antimicrobiana da planta⁴². Os resultados do estudo de Yadegarinia et al.⁹⁴ sugeriram que este não deve ser visto como o único responsável pela atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L., já que o estudo revelou alta propriedade antimicrobiana do óleo essencial mesmo com baixa concentração de mentol (3,6%). Dessa forma, segundo o estudo, pode-se deduzir que outros compostos químicos presentes no óleo podem contribuir para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* L.

Cox et al.²⁵, estudando o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore de chá) e seus componentes, observaram que, em alguns casos, a presença dos componentes do óleo com diferentes propriedades físicas pode influenciar a dispersão dos componentes em solução aquosa, aumentando ou diminuindo a ação antimicrobiana. As características físicas dos componentes podem influenciar a atividade dos óleos essenciais, mas não é só o fator hidrofobicidade que influencia na eficácia; respostas diferentes podem ser encontradas para a estrutura química do princípio puro⁸⁹.

Diante da necessidade de novos fármacos para o tratamento das candidoses, o presente estudo demonstrou que o óleo essencial de *Mentha piperita* L. apresentou atividade antifúngica *in vitro* para *Candida* spp. No entanto, outros estudos são necessários, principalmente em relação à eficácia dos compostos presentes na planta e à determinação do perfil toxicológico.

6.3 Avaliação dos efeitos da infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica

A infusão é uma preparação utilizada para todas as partes de plantas medicinais ricas em componentes voláteis e princípios ativos que se degradam pela ação combinada da água e do calor prolongado. Normalmente, trata-se de partes tenras das plantas, tais como flores, botões e folhas⁵⁵.

A aderência de *Candida* à mucosa bucal do hospedeiro é um importante fator que influencia no equilíbrio dos mecanismos de defesa, colonização da mucosa e desenvolvimento dos sinais clínicos da candidose¹¹. A relação entre aderência de *Candida* ao epitélio e superfícies acrílicas de próteses dentárias, bem como sua capacidade para colonizar e causar doença, têm sido investigada^{3 e 77}. Segundo Samaranayake e MacFarlane⁷⁷, a aderência de *Candida* está diretamente relacionada às formas de candidose bucal. Dessa forma, os agentes inibidores da aderência são importantes no controle da candidose bucal.

Embora a atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L., tanto na forma de extrato como óleo essencial, tenha sido testada em vários microrganismos patogênicos, poucos estudos foram realizados para avaliar seu efeito sobre a aderência de microrganismos presentes na cavidade bucal. No presente estudo, foi avaliada a infusão de *Mentha piperita* L. sobre a aderência à resina acrílica de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC 6258). A infusão de *Mentha piperita* L. não foi capaz de inibir a aderência à resina acrílica das cepas testadas. Entretanto, Navas et al.⁶¹ verificaram que a infusão de *Thymus vulgaris* (tomilho), foi capaz de inibir a aderência de *C. albicans* à resina acrílica, utilizando-se a mesma metodologia de aderência desse trabalho.

Raros trabalhos na literatura foram desenvolvidos para investigar os efeitos de plantas medicinais nos mecanismos de patogenicidade de *Candida*. Hammer et al.⁴¹ usaram o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (árvore de chá) e observaram a inibição reversível da formação do tubo germinativo em *C. albicans*. O óleo, em altas concentrações, inibiu totalmente o crescimento do fungo, enquanto, em baixas concentrações, permitiu somente o crescimento por brotamento. Os principais efeitos parecem manifestar-se sobre a membrana celular, provavelmente associado a características lipofílicas dos monoterpenos presentes no óleo^{24 e 89}.

Na pesquisa de Pina-Vaz et al.⁷¹ o óleo de *Thymus vulgaris* também inibiu a formação de tubo germinativo em *C. albicans*. A formação de tubos germinativos e hifas por *C. albicans* tem sido associada com aumento da aderência às células epiteliais da mucosa⁴⁴ e resistência aos fagócitos, devido as suas dimensões físicas⁷⁸.

O extrato etanólico das folhas de *Streblus asper* nas concentrações de 125 e 250 mg/mL demonstrou 41% e 61% de inibição na formação de tubo germinativo, respectivamente. Além disso, reduziu significativamente a aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas após um minuto de exposição ao extrato na concentração de 125 mg/mL⁹⁰. Segundo os autores, a inibição observada sobre a formação de tubo germinativo parece estar relacionada aos efeitos do extrato sobre a parede celular de *Candida*. Além disso, o extrato poderia interferir na síntese de adesinas ou causar alteração mecânica nas adesinas presentes na camada externa.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados, pode-se concluir que:

- a) o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. apresentou atividade fungistática para algumas cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* quando comparado ao grupo controle;
- b) o extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. demonstrou atividade fungicida sobre cepas de todas as espécies de *Candida* estudadas em relação ao grupo controle;
- c) o óleo essencial de *Mentha piperita* L. exibiu maior atividade inibitória para cepas de *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*;
- d) a infusão de *Mentha piperita* L. não teve efeito sobre a aderência de *Candida* à resina acrílica nas cepas observadas.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol. 2001 Feb.;74(2):113-23.
- 2 Agripino DG, Lima MEL, Silva MR, Meda CI, Bolzani VS, Cordeiro I et al. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest – ecological station Juréia-Itatins. Biota Neotropica. 2004;4(2):1-15.
- 3 Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002 Aug.;78(922):455-9.
- 4 Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J Agric Food Chem. 2001;49(9):4168-70.
- 5 Alves SH, Matta DA, Azevedo AC, Loreto ES, Boff E, Santurio M et al. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. Mycoses. 2006 May;49(3):220-5.

* Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniformrequirements.html>

- 6 Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia Júnior A et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 May/June;95(3):367-73.
- 7 Araújo C, Sousa MJ, Ferreira MF, Leão C. Activity of essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* species against food spoilage yeasts. J Food Prot. 2003;66(4):625-32.
- 8 Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980;25(1):1-10.
- 9 Baba-Moussa F, Akpagana K, Bouchet P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae. J Ethnopharmacol. 1999 Sept.;66(3):335-8.
- 10 Back-Brito GN. Presença de *Candida*, *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal de pacientes HIV positivos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 11 Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005 Apr 1;10 (Suppl 1):E27-39.
- 12 Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999 out./dez.;13(4):343-8.

- 13 Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Junior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Memb Inst Oswaldo Cruz. 2006 June;101(4):387-90.
- 14 Blaszczyk T, Krzyzanowska J, Lamer-Zarawska E. Screening for antimycotic properties of 56 tradicional Chinese drugs. Phytother Res. 2000 May;14(3):210-2.
- 15 Bonjar GHS. Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric. Fitoterapia. 2004;75(1):74-6.
- 16 Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis. J Dent Res. 1995 May;74(5):1152-61.
- 17 Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G. A new generation of antifungal drugs. Rev Iberoam Micol. 2001 Mar.;18(1):2-5.
- 18 Castelucci S, Lima MIS, Nordi N, Marques JGW. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, município de Luís Antonio/SP: uma abordagem etnobotânica. Rev Bras Pl Med. 2000;3(1):51-60.
- 19 Cechinel V Filho, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova. 1998;21(1):99-105.

- 20 Cechinel V Filho, Campos F, Corrêa R, Yunes RA, Nunes RJ. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Quim Nova*. 2003,26(2):230-41.
- 21 Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 set./out.;36(5):599-607.
- 22 Corrêa Júnior C, Ming LC, Scheffer MC. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Jaboticabal: FUNEP; 1994. 162p.
- 23 Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct.;12(4):564-82.
- 24 Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000;88(1):170-5.
- 25 Cox SD, Mann CM, Markham JL. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*. 2001 Sept.;91(3):492-7.
- 26 Cruz MES, Nozaki MH, Batista MA. Plantas medicinais: plantas medicinais e alelopatia. *Biotechnol Ciênc Des*. 2000 jul./ago.;3(15):28-34.
- 27 Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002. 604p.

- 28 Duarte MCT, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2005 Feb.;97(2):305-11.
- 29 Dulger B, Gonuz A, Aysel V. Inhibition of clotrimazole-resistant *Candida albicans* by some endemic *Sideritis* species from Turkey. Fitoterapia. 2006 July;77(5):404-5.
- 30 Ertürk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Biologia. 2006;61(3):275-8.
- 31 Ezzat SM. *In vitro* inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. World J Microbiol Biotechnol. 2001;17(7):757-9.
- 32 Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. Clin Dermatol. 2000 Sept./Oct.;18(5):553-62.
- 33 Fontes OL. Farmácia homeopática: teoria e prática. Barueri: Manole; 2001. 353p.
- 34 Gebara ECE, Zardetto CG, Mayer MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ São Paulo. 1996 out./dez.;10(4):251-6.
- 35 Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan.;13(1):122-43.

- 36 Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res*. 2004 Dec.;18(12):990-5.
- 37 Giusiano G, Mangiaterra M, Garcia Saito V, Rojas F, Gomez V, Diaz MC. Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients [abstract on line]. *Chemotherapy*. 2006 [cited 2007 Feb. 12]; 52(5): [about 6 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed>.
- 38 Guarim G Neto, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras*. 2003;17(4):561-84.
- 39 Guerra MP, Nodari RO. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Ros Petrovick P. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC; 2004. Cap.1, p.13-28.
- 40 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999 June;86(6):985-90.
- 41 Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Med Mycol* 2000;38(5):355-62.

- 42 Iscan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Baser HC, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J Agric Food Chem. 2002;50(14):3943-6.
- 43 Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Rev Odontol Univ São Paulo. 1997;11(4):279-85.
- 44 Kimura L, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1980 May;28(2):464-8.
- 45 Koga-Ito CY, Martins CAP, Jorge AOC. Estudo do Gênero *Candida*. In: Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo: Ed. Santos; 2006. Cap.15, p.219-35.
- 46 Komiyama EY, Ribeiro PM, Junqueira JC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. Braz Oral Res. 2004 jul./set.;18(3):197-201.
- 47 Lacaz CS. Candidíases. São Paulo: EPU; 1980. 190p.
- 48 Lacaz CS. Tratado de micologia médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002. 1104p.
- 49 Liu H. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. Curr Opin Microbiol. 2001 Dec.;4(6):728-35.

- 50 Loguercio AP, Battistin A, De Vargas AC, Henzel A, Witt NM. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*. 2005 mar./abr.;35(2):371-6.
- 51 Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 512p.
- 52 Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev Iberoam Micol*. 2006 Sept.;23(3):176-8.
- 53 Maraschin M, Verpoorte R. Engenharia do metabolismo secundário: otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. *Biotechnol Ciênc Des* [periódico on line]. 1999 set./out. [citado 26 mar. 2007];2(10):24-8. Disponível em: <http://www.biotechnologia.com.br>.
- 54 Mardegan RC, Furletti VF, Duarte MCT, Foglio MA, Gonçalves RB, Höfling JF. Extratos de plantas medicinais com atividade contra *Candida* spp [abstract Pa111]. *Braz Oral Res*. 2005;19 (sp.iss.):124.
- 55 Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: UFV; 1998. 220p.
- 56 Martins MBG, Martins AR, Cavalheiro AJ, Telascrêa M. Caracterização biométrica e química da folha de *Mentha pulegium* x *spicata* (Lamiaceae). *Rev Ciênc Farm*. 2004;25(1):17-23.

- 57 McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potencial health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res.* 2006;20(8):619-33.
- 58 Menezes EA, Guerra ACP, Rodrigues RCB, Peixoto MMLV, Lima LS, Cunha FA. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. *J Bras Patol Med Lab.* 2004 ago.;40(5):299-305.
- 59 Migliorati CA, Birman EG, Cury AE. Oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients under treatment with protease inhibitors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Sept.;98(3):301-10.
- 60 Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 2003 May;69(5):413-9.
- 61 Navas EAFA, Carretto CFP, Paradella TC, Oliveira LD, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* [abstract Pa133]. *Braz Oral Res.* 2006;20(sp.iss.):167.
- 62 Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2001 Nov.;44(9/10):361-7.
- 63 Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990 Feb.;48(1):71-4.

- 64 Oliveira EE, Silva SC, Soares AJ, Attux C, Cruvinel B, Silva MRR. Toxinas *Killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. Rev Soc Bras Med Trop. 1998 nov./dez;31(6):523-7.
- 65 Olsen I. Oral adhesion of yeasts. Acta Odontol Scand. 1990 Feb.;48(1):45-53.
- 66 Oumzil H, Ghouлами S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. Phytother Res. 2002;16(8):727-31.
- 67 Pasa MC, Soares JJ, Guarim Neto G. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). Acta Bot Bras. 2005;19(2):195-207.
- 68 Pattnaik S, Subramanyam VR, Kole C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. Microbios. 1996;86(349):237-46.
- 69 Penha SS, Birman EG, Silveira FRX, De Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. Pesq Odontol Bras. 2000 abr./jun.;14(2):119-22.
- 70 Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. Rev Saúde Pub. 2004;38(2):326-8.

- 71 Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004 Jan.;18(1):73-8.
- 72 Posteraro B, Tumbarello M, La Sorda M, Spanu T, Trecarichi EM, De Bernardis F et al. Azole resistance of *Candida glabrata* in a case of recurrent fungemia. J Clin Microbiol. 2006 Aug.;44(8):3046-7.
- 73 Querido SMR. Microrganismos superinfetantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 74 Rehder VLG, Machado ALM, Delarmelina C, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte MCT. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. Rev Bras Pl Med. 2004;6(2):67-71.
- 75 Reis MS, Mariot A, Steenbock W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Ros Petrovick P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC; 2004. Cap.3, p.46-74.

- 76 Rodrigues CR, Faquin V, Trevisan D, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Rodrigues TM. Nutrição mineral, crescimento e teor de óleo essencial da menta em solução nutritiva sob diferentes concentrações de fósforo e épocas de coleta. Horti Bras [periódico on line]. 2004 jul./set. [citado 19 mar. 2007];22(3):573-8. Disponível em: <http://www.scielo.br>.
- 77 Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral candidosis. London: Wright; 1990. 265p.
- 78 Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. Clin Microbiol Rev. 2001 Apr;14(2):398-429.
- 79 Sandes ARR, Di Blasi G. Biodiversidade e diversidade química e genética: aspectos relacionados com a propriedade intelectual no Brasil. Biotecnol Ciênc Des [periódico on line]. 2000 mar./abr. [citado 26 mar. 2007];2(13):28-32. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>.
- 80 Santos BR, Paiva R, Castro EM, Cardoso MG, Rezende RKS, Paiva PDO. Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng). Ciênc Agrotec. 2004;28(2):345-9.
- 81 Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 2004 Dec.;35(4):275-80.

- 82 Sherman RG, Prusinski L, Ravenel MC, Joralmon RA. Oral candidosis. Quintessence Int. 2002 Jul-Aug;33(7):521-32.
- 83 Siani AC, Sampaio ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Sousa Ramos MF. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. Biotecnol Ciênc Des [periódico on line]. 2000 set./out. [citado 26 mar. 2007];3(16):38-43. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>.
- 84 Silva KL, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Quim Nova. 2002;25(3):449-54.
- 85 Silva MV, Costa TR, Costa MR, Ferreira EC, Fernandes OFL, Santos SC et al. Growth inhibition effect of Brazilian Cerrado plant extracts on *Candida* species. Pharmaceutical Biology. 2001;39(2):138-41.
- 86 Spitzer CMOSV. Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Ros Petrovick P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC; 2004. Cap.18, p.467-95.
- 87 Stenderup A. Oral mycology. Acta Odontol Scan. 1990 Feb.;48(1):3-10.
- 88 Suffredini IB, Paciencia MLB, Nepomuceno DC, Younes RN, Varella AD. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts: Clusiaceae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 May;101(3):287-90.

- 89 Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. Mycopathologia [serial on line]. 2005 Apr. [cited 2005 sept. 13];159(3):339-45. Disponível em: <http://www.gateway.ut.ovid.com>.
- 90 Taweekhaisupapong S, Choopan T, Singhara S, Chatrchaiwiwatana S, Wongkham S. *In vitro* inhibitory effect of Streblus asper leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. J Ethnopharmacol. 2005 Jan.;96(1-2):221-6.
- 91 Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Feb.;93(2):155-60.
- 92 Tosun I, Aydin F, Kaklikkaya N, Erturk M. Induction of secretory aspartyl proteinase of *Candida albicans* by HIV-1 but not HSV-2 or some other microorganisms associated with vaginal environment. Mycopathologia. 2005 Feb.;159(2):213-8.
- 93 Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998 Feb.;43(1):45-50.

- 94 Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*. 2006 June;67(12):1249-55.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / suely@fojc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **08/2007-PH/CEP**, sobre
“**Atividade antimicrobiana de Mentha piperita L. sobre leveduras do gênero Cândida**”, sob a responsabilidade de **CLAUNENCIL DE FÁTIMA PIRES CARRETTO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de fevereiro de 2007.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Apêndice A – Informações complementares das amostras de *Candida*.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida albicans* (continua)

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
1	31,25	62,5	125	125
2	31,25	62,5	125	125
3	62,5	125	125	250
4	62,5	62,5	125	125
5	31,25	62,5	62,5	125
6	31,25	31,25	62,5	125
7	62,5	62,5	125	125
8	31,25	31,25	62,5	62,5
9	31,25	31,25	62,5	62,5
10	31,25	62,5	62,5	125
11	62,5	62,5	125	125
12	31,25	62,5	62,5	125
13	62,5	62,5	125	125
14	31,25	125	62,5	250
15	31,25	31,25	62,5	62,5
16	31,25	31,25	62,5	62,5
17	31,25	62,5	62,5	125
18	62,5	62,5	125	125
19	31,25	62,5	125	125
20	31,25	31,25	125	125
21	31,25	62,5	62,5	125
22	31,25	62,5	62,5	125

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida albicans* (continua)

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
23	31,25	62,5	125	125
24	31,25	62,5	62,5	125
25	31,25	62,5	62,5	125
26	31,25	62,5	62,5	125
27	62,5	62,5	125	125
28	31,25	31,25	62,5	125
29	31,25	31,25	62,5	125
30	31,25	31,25	62,5	125
31	31,25	31,25	62,5	62,5
32	31,25	31,25	62,5	62,5
33	31,25	31,25	62,5	62,5
34	31,25	62,5	62,5	125
35	31,25	31,25	62,5	125
36	31,25	31,25	62,5	125
37	31,25	31,25	62,5	62,5
38	31,25	31,25	62,5	125
39	31,25	31,25	62,5	62,5
40	31,25	31,25	62,5	125
41	31,25	31,25	62,5	62,5
42	31,25	31,25	125	125
43	31,25	31,25	125	125
44	62,5	62,5	125	125
45	31,25	31,25	62,5	62,5

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida albicans* (conclusão)

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
46	31,25	62,5	62,5	125
47	31,25	31,25	62,5	62,5
48	31,25	31,25	62,5	125
49	31,25	31,25	62,5	62,5
50	62,5	62,5	125	125

Tabela 8 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida tropicalis*

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
1	15,62	15,62	62,5	125
2	31,25	61,25	62,5	125
3	15,62	15,62	125	125
4	31,25	31,25	125	125
5	31,25	31,25	62,5	125
6	31,25	62,5	62,5	125
7	31,25	31,25	125	125
8	31,25	31,25	62,5	125
9	31,25	62,5	62,5	250
10	62,5	62,5	125	125

Tabela 9 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida glabrata*

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
1	62,5	62,5	125	125
2	62,5	62,5	62,5	125
3	31,25	62,5	125	250
4	62,5	62,5	125	125
5	31,25	62,5	62,5	125
6	62,5	62,5	125	125
7	62,5	62,5	62,5	125
8	62,5	62,5	62,5	62,5
9	62,5	62,5	62,5	62,5
10	62,5	62,5	125	125

Tabela 10 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida parapsilosis*

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
1	62,5	62,5	62,5	125
2	62,5	62,5	125	125
3	62,5	62,5	125	125
4	62,5	62,5	125	125
5	62,5	62,5	125	250
6	62,5	62,5	125	125
7	62,5	62,5	125	125
8	62,5	62,5	125	125

Tabela 11 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) extrato hidroalcoólico de *Mentha piperita* L. e do grupo controle para as amostras de *Candida krusei*

Amostras	CIM (mg/mL)		CFM (mg/mL)	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle
1	62,5	62,5	125	250
2	62,5	62,5	125	250

Tabela 12 – Números de UFC/mL (Log) de *C. albicans* (ATCC 18804) que se aderiram à resina acrílica nos grupos infusão e controle

Corpos-de-prova	Infusão	Controle
1	4,53656	4,71391
2	4,66323	4,23553
3	4,25164	4,17609
4	4,44483	4,79309
5	4,12710	4,35218
6	4,78247	4,11394
7	4,42651	3,97081
8	4,30103	4,29557
9	4,24920	3,96614
10	4,08458	3,68124
11	4,43537	4,43933
12	4,67624	4,46835
13	4,18752	4,31806
14	4,44871	4,09342
15	4,57171	4,12385
Média ± Desvio-padrão	4,41 ± 0,21	4,24 ± 0,28

Diferença estatisticamente não significativa, $p = 0,088$

Tabela 13 - Números de UFC/mL (Log) de *C. glabrata* (ATCC 90030) que se aderiram à resina acrílica nos grupos infusão e controle

Corpos-de-prova	Infusão	Controle
1	4,47056	4,24920
2	4,40739	4,05308
3	4,40993	4,82217
4	4,50853	4,53148
5	4,58771	4,02325
6	4,42325	4,37475
7	4,64542	4,41996
8	4,10721	4,52114
9	4,40140	4,29336
10	4,44170	4,39445
11	4,31597	4,41581
12	4,51983	4,29115
13	4,05500	4,22011
14	4,30103	4,15229
15	4,78032	4,74702
Média ± Desvio-padrão	4,42 ± 0,18	4,36 ± 0,22

Diferença estatisticamente não significativa, $p = 0,45$

Tabela 14 - Números de UFC/mL (Log) de *C. tropicalis* (ATCC 13803) que se aderiram à resina acrílica nos grupos infusão e controle

Corpos-de-prova	Infusão	Controle
1	4,02735	4,28780
2	4,32634	4,53466
3	4,10380	4,39094
4	4,50583	4,47712
5	4,33143	3,89763
6	3,92942	4,31387
7	4,47422	4,50515
8	4,40483	4,35984
9	4,29667	3,96614
10	3,91116	3,96614
11	4,51121	4,01284
12	4,40140	3,93952
13	4,53084	4,47422
14	4,48996	4,40140
15	4,29115	3,89763
Média ± Desvio-padrão	4,30 ± 0,21	4,22 ± 0,24

Diferença estatisticamente não significativa, $p = 0,39$

Tabela 15 - Números de UFC/mL (Log) de *C. krusei* (ATCC 6258) que se aderiram à resina acrílica nos grupos infusão e controle

Corpos-de-prova	Infusão	Controle
1	4,47056	4,07555
2	4,51255	4,27646
3	3,91645	4,60206
4	4,47129	4,35411
5	4,56937	3,81954
6	4,61490	4,49969
7	4,37749	4,17464
8	4,56937	4,14301
9	4,39358	4,10037
10	4,48430	4,20003
11	4,39445	3,94694
12	4,29994	4,31911
13	4,39967	4,39445
14	4,20412	4,58939
15	4,13194	4,17319
Média ± Desvio-padrão	4,38 ± 0,18	4,24 ± 0,22

Diferença estatisticamente não significativa, $p = 0,067$

Carretto CFP. Antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. against *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

ABSTRACT

Fungi belonging to Candida species are opportunistic pathogens that can cause local and systemic infections. The investigation of natural products against Candida spp. increased significantly in the last few years. In this present study, the ethanolic extract and essential oil from Mentha piperita L. were evaluated for antimicrobial activity against Candida spp., being fifty strains from C. albicans, ten from C. glabrata, ten from C. tropicalis, eight from C. parapsilosis and two C. krusei. The minimal inhibition concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of the ethanolic extract (500 g of fresh plant / 1 L of ethanol) were determined by the broth dilution method. The control group was constituted by ethanol in the same proportion of the extract (79°GL). The antimicrobial activity of the essential oil was performed by the agar diffusion method. Besides, it was observed the effect of Mentha piperita L. infusion on the adherence of standard strains of C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis and C. krusei to the acrylic resin. The results showed that ethanolic extract of Mentha piperita L. presented fungistatic activity to some strains of C. albicans, C. glabrata and C. tropicalis, and also fungicidal activity on strains of all Candida species in comparison with the control group. The essential oil of Mentha piperita L. was more active to strains of C. albicans followed by C. tropicalis and C. parapsilosis. The infusion of Mentha piperita L. was not effective to inhibit the Candida adherence to the acrylic resin. It was concluded that Mentha piperita L. was more active to strains of C. albicans and C. tropicalis, but was not effective to have any effect on the adherence of these microorganisms to the acrylic resin.

Key Words: Mentha piperita; yeasts; Candida; microbial sensitivity tests; oils, volatile; plants, medicinal; acrylic resins.