



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**GIOVANA CLÁUDIA BONI**

**AÇÃO ANTIFÚNGICA DE BIOCOMPONENTES DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *MENTHA* SPP. SOBRE ESPÉCIES DE  
*CANDIDA*.**

Piracicaba

2020

GIOVANA CLÁUDIA BONI

**AÇÃO ANTIFÚNGICA DE BIOCOMPONENTES DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *MENTHA* SPP. SOBRE ESPÉCIES DE  
*CANDIDA*.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
GIOVANA CLÁUDIA BONI, ORIENTADA PELO  
PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING

Piracicaba

2020

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

B641a Boni, Giovana Cláudia, 1985-  
Ação antifúngica de biocomponentes do óleo essencial de *Mentha* spp.  
sobre espécies de *Candida* / Giovana Cláudia Boni. – Piracicaba, SP : [s.n.],  
2020.

Orientador: José Francisco Hofling.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba.

1. *Mentha*. 2. *Candida*. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Atividade  
antifúngica. I. Hofling, José Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Antifungal action by biocomponents of *Mentha* spp essential oil  
against *Candida* species

**Palavras-chave em inglês:**

*Mentha*

*Candida*

Essences and essential oils

Antifungal activity

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

José Francisco Hofling [Orientador]

Natália Leal Vizoto

Daniela Defávares do Nascimento

Renato Assis Machado

Débora Campanella Bastos

**Data de defesa:** 28-02-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6900-1162>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4346270145333067>



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de fevereiro de 2020, considerou a candidata GIOVANA CLÁUDIA BONI aprovada.

PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. NATÁLIA LEAL VIZOTO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DANIELA DEFÁVARI DO NASCIMENTO

PROF. DR. RENATO ASSIS MACHADO

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DÉBORA CAMPANELLA BASTOS

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Deus, que me permitiu trilhar os caminhos que escolhi.

A minha amada mãe Maria Sandra da Silva Boni que sempre me guiou para escolher os caminhos do bem e sempre esteve ao meu lado em todas as decisões me auxiliando de todas as formas possíveis para que eu alcançasse os meus sonhos.

Ao meu amado pai Ademir Boni, que no meio do meu doutorado foi morar no céu, mas de lá me deu forças para continuar essa jornada e me dá forças para seguir em busca dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Fábio Ricardo Boni e Juliano César Boni que sempre me apoiaram, ao meu namorado Vitor Alves de Andrade Júnior que esteve ao meu lado nos momentos bons e nos mais difíceis dessa jornada e à minha sobrinha Lana Fernandes Boni que torna os meus dias mais alegres. À todos meus familiares que sempre me apoiaram.

Ao meu orientador José Francisco Höfling pela oportunidade, pelos ensinamentos e pela confiança em meu trabalho.

À minha amiga querida e parceira de trabalho Simone Nataly Busato de Feiria pelos ensinamentos e pela amizade.

## AGRADECIMENTOS

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 140955/2016-0”

À Universidade Estadual de Campinas e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, agradeço pela oportunidade de estudar nesse centro de excelência em ensino, pesquisa e extensão.

Aos professores da Área, Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner e Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp e ao Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, pesquisador colaborador da área, pelo aprendizado e conhecimento transmitido.

Aos Professores que aceitaram compor a banca titular da defesa, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natália Leal Vizoto, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Defavari do Nascimento, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Campanella Bastos e Prof. Dr. Renato Assis Machado.

Às Professoras Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina Anibal e Dr<sup>a</sup>. Denise Madalena Palomari Spolidório por aceitarem compor a banca examinadora suplente da tese.

Às professoras Dr<sup>a</sup> Renata de Oliveira Mattos Granner, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Oliveira de Lima e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Cristina Anibal por comporem a banca de Qualificação.

À Valéria Alessandra Defavari Franco, técnica do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, à Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, técnica da Microscopia Eletrônica de Transmissão, pelo auxílio nos trabalhos desenvolvidos.

À todos companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (em ordem alfabética) Eduardo Martinelli Franco, Felipe Jóia, Flávia Camila Maia, Gayan Kanchana Wijesinghe, Geovanny Nilton Cuya Salvatierra, Hassan Naveed, Janaina Priscila Barbosa, Lívia Araújo Alves, Marcelle Marie Buso Ramos, Mateus Cardoso Oliveira, Natália Leal Vizoto, Paula Cristina Anibal, Thaís Rossini de Oliveira, Simone Nataly Busato de Feiria, Vanessa da Silva Cardoso, Vítor Aragão Abreu de Freitas e todos outros companheiros que já passaram pelo laboratório, grata pela convivência e conhecimento compartilhado.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho durante esses anos.

*“Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.*

*Galileu Galilei*

## Resumo

*Candida* spp. tem se tornado um problema de saúde pública por desenvolver resistência aos antifúngicos já disponíveis. Nesse sentido, plantas medicinais, em especial *Mentha* spp. tem sido alvo de estudos na busca de novos agentes antifúngicos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antifúngica de biocomponentes do óleo essencial de *Mentha* spp. isolados e em associação contra espécies de *Candida*. A ação antifúngica dos compostos carvona, mentona, mentofurano e pulegona isolados e em associação sobre espécies de *Candida* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. A biomassa do biofilme uniespécie de *Candida albicans* e duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* foram avaliados após tratamento com os compostos. A ação dos compostos nas células de *Candida albicans* foi avaliada em Citômetro de Fluxo e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Os compostos isolados e em associação apresentaram ação antifúngica contra todas as espécies de *Candida* testadas. Apenas os compostos isolados carvona e pulegona impediram a formação mínima de 50% da biomassa do biofilme uniespécie e duo-espécie. Nenhum dos compostos ou combinações desconstruíram no mínimo em 50% o biofilme maduro. A análise em citômetro de fluxo mostrou ação na membrana citoplasmática e formação de Espécies Reativas de Oxigênio dose-dependente após os tratamentos. A análise em MET mostraram alterações na membrana citoplasmática e formação de vacúolos citoplasmáticos após os tratamentos. Os resultados do presente estudo mostram que os compostos isolados do óleo essencial de *Mentha* spp. possuem ação antifúngica contra espécies de *Candida*, sugerindo nova fonte de compostos antifúngicos para atuar individualmente ou como coadjuvantes a tratamentos convencionais.

Palavras chave: *Mentha* spp. *Candida* spp. Óleo essencial. Ação antifúngica.

## Abstract

*Candida* spp. has become a public health problem because develops resistance to antifungals. In this sense, medicinal plants, especially *Mentha* spp. has been the subject of studies in the search for new antifungal agents. The objective of this work was to evaluate the antifungal action of biocomponents from essential oil of *Mentha* spp. isolated and in association against *Candida* species. The antifungal action of carvone, mentone, menthofuran and pulegone isolated and in combination against *Candida* species was determined by broth microdilution method. The biomass of *Candida albicans* biofilm and duo-species biofilm (*Candida albicans* and *Streptococcus mutans*) were evaluated after treatment with the compounds. The action of the compounds in *Candida albicans* cells was evaluated in Flow Cytometer and Transmission Electron Microscope (MET). The isolated and combined compounds showed antifungal action against *Candida* species. Only carvone and pulegone prevented the formation in 50% of the biomass of the unique specie and duo-species biofilm. The compounds or combinations deconstruct 50% of the mature biofilm. The analysis in Flow cytometer showed action on the cytoplasmic membrane and Reactive Oxygen Species formation dose-dependent after treatments. The analysis in MET showed changes in the cytoplasmic membrane and cytoplasmic vacuoles formation after treatments. The results of the present study show that compounds isolated from the essential oil of *Mentha* spp. has antifungal action against *Candida* species, suggesting a new source of antifungal compounds to as such or as adjuvants to conventional treatments.

Key words: *Mentha* spp. *Candida* spp. Essential oil. Antifungal action.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 sem os tratamentos	35
Figura 2: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com carvona	36
Figura 3: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com mentona	36
Figura 4: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com mentofurano	36
Figura 5: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com pulegona	37
Figura 6: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com carvona e pulegona	37
Figura 7: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com carvona e mentona	37
Figura 8: Imagens obtidas por MET do controle de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após o tratamento com mentona e pulegona	38
Figura 9: Gráfico do biofilme em formação de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após tratamento com compostos isolados	39
Figura 10: Gráfico do biofilme em formação de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após tratamento com compostos em associação	39
Figura 11: Gráfico do biofilme maduro de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após tratamento com compostos isolados	40
Figura 12: Gráfico do biofilme maduro de <i>Candida albicans</i> MYA-2876 após tratamento com compostos em associação	40
Figura 13: Biofilme duo espécie tratados com compostos isolados	41
Figura 14: Biofilme duo espécie tratados com compostos em associação	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de sensibilidade das cepas de <i>Candida</i> spp. após tratamentos	32
Tabela 2: Classificação pelo ICIF	33
Tabela 3: Concentrações (mg/ml) dos compostos em associação que inibiram o crescimento de <i>Candida</i> spp.	33
Tabela 4: Dados obtidos em Citômetro de Fluxo de <i>Candida albicans</i> MYA 2876 após tratamento com os compostos (concentrações sub-CIM)	34
Tabela 5: Dados obtidos em Citômetro de Fluxo de <i>Candida albicans</i> MYA 2876 após tratamento com os compostos (concentrações sub-biofilme)	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- *American Type Culture Collection*

BHI- Brain Heart Infusion

CBS- *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

CV- Cristal violeta

DHR-1,2,3- *Dihydrorhodamine 123*

DiOC6 (3) - *3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide*

HIV- *Human Immunodeficiency Vírus*

ICIF- Índice de Concentração Inibitória Fracionária

IP: Iodeto de Propídeo

MET- Microscópio Eletrônico de Transmissão

PBS- *Phosphate Buffered Saline*

RPMI–1640 Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

ROS- *Reactive oxygen species*

SDA- *Sabouraud Dextrose Agar*

SUB-CIM- Uma concentração abaixo da CIM

SUB- biofilme- A concentração que impede ou desconstrói 50% do biofilme

TSB- *Tryptone Soy Broth*

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UTI- Unidade de Tratamento Intensivo

YPD- *Yeast Peptone Dextrose*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio</b>	<b>62</b>

## INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado no decorrer dos últimos anos e embora sejam menos frequentes comparadas a infecções bacterianas, o número desse tipo de infecção tem aumentado especialmente em pacientes hospitalizados em Unidade de tratamento Intensivo, uma vez que esse tipo de infecção é oportunista e acomete indivíduos com a imunidade comprometida (Garbee et al.,2017).

*Candida* spp. são organismos comensais da microbiota humana que habitam a pele e mucosas de indivíduos saudáveis, porém, em determinadas condições que podem envolver rompimento de barreiras físicas, fatores de virulência do microrganismo e resposta imune do hospedeiro, podem causar infecções denominadas candidíases (Pappas et al., 2018).

Diversas espécies de *Candida* podem causar doenças em humanos mas as principais espécies descritas na literatura associadas a infecções são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida Krusei*. Atualmente, a espécie *Candida auris* também tem sido descrita como um importante agente patogênico, presente em surtos nosocomiais registrados na Ásia (Japão, Índia e Paquistão), no Reino Unido, na Espanha, na Colômbia, na Venezuela, no Panamá e nos Estados Unidos (Pappas et al., 2018). O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) descreveram que cerca de 46 mil casos de infecções por *Candida* spp. ocorrem por ano nos Estados Unidos e apontou *Candida* spp. como causa mais comum de infecções da corrente sanguínea (Garbee et al.,2017). No Brasil em estudo epidemiológico feito por Colombo et al. (2003) no período de março de 2002 a fevereiro de 2003 em 4 hospitais de São Paulo, das infecções da corrente sanguínea, 4,3% eram causadas por espécies de *Candida*.

Por outro lado, muitos medicamentos tem sido usados para controlar as infecções por *Candida*, sendo eles os polienos, os azóis e as equinocandinas. No entanto, apesar dos medicamentos já disponíveis para o tratamento dessas infecções, esses organismos têm desenvolvido resistência a tais antifúngicos (Ben-Ami, 2018; Pappas et al., 2018). Sendo assim, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos são necessários para atuar contra tais microrganismos (Pappas et al., 2018). Paralelamente, devido à rica composição de componentes com efeitos

biológicos, as plantas tem sido alvo de muitas pesquisas com finalidade de se encontrar compostos efetivos, inclusive contra organismos resistentes, para serem novas fontes alternativas de tratamento (Stringaro et al., 2018; Freire et al., 2017; Rajkowska et al., 2017; Powers et al., 2018; Dukic et al., 2003; Mkaadem et al., 2009; Arruda et al., 2006).

Nesse contexto, os biocomponentes presentes no óleo essencial das plantas tem demonstrado efeito antimicrobiano sobre diversas espécies de microrganismos. Os óleos essenciais são misturas complexas de diversos compostos voláteis obtidos a partir de material vegetal. O gênero *Mentha* spp. abrange aproximadamente 25 a 30 espécies e faz parte da família Lamiaceae, uma das mais importantes na produção de óleos essenciais, a qual tem sido amplamente estudada por conter espécies com ações biológicas. Dentre as atividades biológicas descritas, as mais citadas na literatura são propriedades antibacterianas e antifúngicas (Stringaro et al., 2018).

Estudos encontrados na literatura apontam atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Mentha piperita* (Freire et al., 2017; Rajkowska et al., 2017; Powers et al., 2018), *Mentha spicata* (Powers et al., 2018), *Mentha longifolia* (Ertas et al., 2015), *Mentha pulegium* (Abdelli, et al., 2016) e *Mentha suaveolens* (Spagnoletti et al., 2016; Scazzocchio et al., 2016) sobre diferentes espécies de *Candida*. Carvona, mentona (Hussain et al., 2010), mentofurano (Abolfazl et al., 2014) e pulegona (Arruda et al., 2006), biocomponentes isolados a partir do óleo essencial de diversas espécies de *Mentha*, também tem sido apontados como responsáveis pela atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, incluindo espécies de *Candida*.

Sendo assim, estudos que abordem o tema sobre a eficácia dos compostos isolados ou em sinergismo entre os compostos do óleo essencial de *Mentha* spp. sobre espécies de *Candida* tem contribuído para a descoberta de novos agentes antifúngicos que atuem isoladamente ou como coadjuvantes aos tratamentos já disponíveis.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Candida* spp.

*Candida* spp. são microrganismos que pertencem ao Reino Funghi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (Guarro et al., 1999). As células de *Candida* spp. apresentam-se individualmente, de forma arredondada ou oval, medindo aproximadamente 2,0 a 6,0 µm (Schulze e Sonnenborn, 2009). Em determinadas condições como mudança de pH e exposição ao soro sanguíneo, as leveduras podem assumir a forma de hifas (Gow et al., 2011; Vylcova et al., 2011; Jacobsen et al., 2012). Essa habilidade de transição morfológica é chamada de dimorfismo. As diferentes formas que o fungo pode apresentar são significativas para sua patogenicidade e estão envolvidas no seu processo de infecção (Mayer et al., 2013). A célula leveduriforme favorece a disseminação do fungo pela corrente sanguínea enquanto a forma filamentosa favorece a invasão tecidual (Jacobsen et al., 2012; Santana et al., 2013; Mayer et al., 2013).

As espécies de *Candida* são consideradas organismos comensais da microbiota intestinal e da pele humana e detectáveis em aproximadamente 60% dos indivíduos saudáveis (McCarty e Pappas, 2016; Kullberg e Arendrup, 2015; Pappas et al., 2018). Porém, algumas condições que expõe o indivíduo a um número exacerbado do microrganismo ou o acesso dele à corrente sanguínea (candidemia) pode resultar em infecção. O uso prolongado e/ou excessivo de antimicrobianos de amplo espectro que pode permitir o aumento da colonização de *Candida* spp. através do crescimento seletivo (McCarty e Pappas, 2016; Kullberg e Arendrup, 2015; Fan et al., 2015); o rompimento da barreira intestinal que pode ocorrer durante um procedimento cirúrgico resultando na translocação do microrganismo da mucosa intestinal para a corrente sanguínea e disseminação para outros órgãos, pode resultar em disseminação e colonização nesses locais; condições de imunossupressão como o tratamento quimioterápico ou pacientes HIV positivos podem impedir que o sistema imune atue contra tais organismos e permitir a proliferação exacerbada dos mesmos. Tais condições permitem que o microrganismo transite do estado de comensalismo para oportunismo, resultando em infecção (McCarty e Pappas, 2016; Kullberg e Arendrup, 2015; Netea et al., 2015; Lionakis et al., 2014; Puel et al., 2012).

Uma vez na corrente sanguínea, o microrganismo pode disseminar e acometer outros órgãos, se aderindo às células através de adesinas presentes na sua superfície (Phan et al., 2007). Posteriormente, o microrganismo pode penetrar e invadir tecidos e vasos sanguíneos. Este episódio pode ser através de um mecanismo de indução de endocitose o qual proteínas que são expressas na superfície da célula podem se ligar às proteínas da superfície celular epitelial, induzindo a célula epitelial a produzir pseudópodes que engolfam o organismo e o puxam para o interior da célula. O processo de invasão pode ser também através da penetração ativa de uma hifa entre as células epiteliais (Dalle et al., 2009; Phan et al., 2007; Park et al., 2005). Após a invasão, pode ocorrer danos às células do indivíduo pela secreção de enzimas líticas do microrganismo, como aspartil proteases (Zhu e Filler, 2010). Uma vez estabelecido o quadro infeccioso com invasão do tecido e vasos sanguíneos, o tecido infectado pode se romper, disseminar na corrente sanguínea e iniciar um novo ciclo de infecção ao passo que é retomada o início da disseminação vascular do microrganismo podendo acometer diversos órgãos (Pappas, 2018).

Diversas espécies de *Candida* podem causar doenças em seres humanos, porém, as principais espécies associadas a candidemias e infecções são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (McCarty e Pappas, 2016; Kullberg e Arendrup, 2015; Pappas et al., 2003, Wisplinghoff et al., 2004). Ainda, um novo patógeno do gênero tem sido relatado em infecções nosocomiais com taxas de mortalidade, a espécie *Candida auris* (Chowdhary e Meis, 2017; Lockhart, et al., 2017). Globalmente, *Candida albicans* é a principal espécie causadora de infecções desse gênero de espécies. No Brasil, *Candida albicans* é a espécie mais encontrada em candidemias e infecções, seguida de *Candida parapsilosis* em aproximadamente 25% dos casos, *Candida tropicalis* em 15% e *Candida glabrata* em 10% (Pappas et al., 2018).

Na cavidade oral, a espécie *Candida albicans* faz parte da microbiota e estima-se que esteja presente neste nicho em aproximadamente 30-55% dos indivíduos saudáveis (Millsop e Fazel, 2016; Singh et al., 2014). Porém, além dos fatores de risco já citados anteriormente, como por exemplo a condição imunológica do indivíduo, fatores locais como xerostomia, uso de próteses; podem causar um

crescimento excessivo das espécies na mucosa oral e favorecer o estabelecimento da candidíase oral (Millsop e Fazel, 2016).

Na candidíase oral, *Candida albicans* é isolada em aproximadamente 80% dos casos, (Mc Cullough et al, 1999; Reichart et al, 2000; Millsop e Fazel, 2016), porém, outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* também podem ser encontradas em tal condição (Pfaller e Diekema 2007; Williams et al. 2011; Rodrigues et al.,2016).

### **2.1.1 Biofilmes de *Candida* spp.**

Além do estado de imunossupressão do indivíduo que pode ser ocasionado por diversos fatores, características particulares das espécies e mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos contribuem para a infecção, sendo esses chamados de fatores de virulência (Kullberg e Arendrup, 2015; Gow e al., 2011; Netea et al., 2015; Fan et al., 2015). Dentre os fatores, um importante contribuinte para patogênese durante a infecção por espécies de *Candida* é a formação do biofilme. Os biofilmes são de forma geral, descritos como comunidades de microrganismos altamente organizados, e tipicamente cercados por uma matriz autoproduzida de substâncias exopoliméricas, denominada matriz extracelular (Wall et al., 2019; Donlan, 2002).

Com processos altamente regulados e coordenados, o biofilme proporciona diversas vantagens às células presentes, como ambiente seguro onde há proteção contra estresses ambientais, incluindo as defesas imunológicas do hospedeiro e de tratamentos antimicrobianos. Isto favorece a comunicação via “*Quórum Sensing*” que podem regular a expressão de genes relacionados a virulência e resistência e favorecer a transferência horizontal de genes entre outras vantagens (Santana et al., 2013).

No biofilme de *Candida* spp., a proteção exercida pela matriz é um dos principais contribuintes para a resistência à agentes antifúngicos, pois impede a penetração de moléculas nas profundezas do biofilme, impossibilitando assim a morte de todas as células presentes (Wall et al., 2019). Sendo assim, o biofilme pode atuar como reservatório de fontes persistentes de infecções (Wall et al., 2019; Uppuluri

et al., 2009; Fazli et al., 2013). Ainda, distintos componentes expostos na matrix extracelular podem ser responsáveis pela evasão do sistema imunológico do hospedeiro. A diferença da interação de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) de células do sistema imunológico do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), é diferente quando a célula fúngica está em estado planctônico. Sendo assim, o biofilme pode contribuir para a evasão imune (Mitchell et al., 2016; Fazli et al., 2013; Wall et al., 2019). Em particular, as células de *Candida* spp. presentes em biofilmes são protegidas contra neutrófilos, macrófagos e monócitos, que normalmente desempenham papéis importantes na resposta imune contra a candidíase (Fazli et al., 2013; Wall et al., 2019).

A espécie *Candida albicans* é a mais associada a formação de biofilmes (Wall et al., 2019; Brown et al., 2012). A formação do biofilme dessa espécie tem como fase inicial a adesão das leveduras a uma superfície formando uma camada basal. Na fase intermediária, ocorre a proliferação celular, transição morfológica para hifas. A transição morfológica favorece a adesão do microrganismo ao tecido do hospedeiro (Mayer et al., 2013, Lo et al., 1997; Murad et al., 2001) e adesão entre as células fúngicas formando emaranhados filamentosos. Esses emaranhados de filamentos, se intercalam originando redes de hifas, o que forma grande parte da arquitetura do biofilme tornando-o mais robusto (Wall et al., 2019). Na fase final de maturação do biofilme, ocorre a produção da matriz extracelular, uma manta de substâncias exopoliméricas que envolve toda estrutura do biofilme. A matriz extracelular do biofilme de *Candida albicans* é dinâmica e pode ser afetada por diversos fatores como condições de crescimento, temperatura, pH, etc., resultando em alterações da composição. De forma geral, é composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios, DNA extracelular que interagem entre si (Mitchell et al., 2016; Pierce et al., 2017; Wall et al., 2019; Ramage et al., 2006).

Após a maturação, na fase de dispersão, o biofilme libera na corrente sanguínea fragmentos que poderão formar novos focos de infecção, reiniciando o ciclo de formação do biofilme em outros ambientes (Uppuluri et al., 2009; Wall et al., 2019).

### **2.1.2 Interação de *Candida* spp. e *Streptococcus mutans* no biofilme oral.**

A cavidade oral humana é normalmente colonizada por uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários. Dentro dos diferentes microambientes orais, esses organismos são frequentemente encontrados em biofilmes, exibindo comportamento de cooperação entre os diferentes membros dessa estrutura (Montelongo-Jauregui e Lopez-Ribot, 2018).

As espécies de microrganismos que habitam esse ambiente variam entre os indivíduos, levando em consideração diferenças como a dieta, estado de saúde, idade e diferentes microambientes que habitam dentro da cavidade oral, como dentes, saliva, língua, gengiva ou mucosa oral (Delgado-Silva et al., 2014; Costalonga et al., 2014). Dentro dos diferentes microambientes orais, esses microrganismos são frequentemente encontrados em biofilmes. O biofilme oral se forma a partir de colonizadores iniciais predominantemente do grupo dos estreptococos que ligam-se a superfície a ser colonizada. Banhados pela saliva e seus componentes, formam uma película. Após, colonizadores primários se ligam a essa película e posteriormente ocorre a co-adesão de colonizadores secundários (Yao et al., 2003; Busscher e Van der Mei, 1997) formação da matriz extracelular, maturação do biofilme e dispersão (Chevalier et al., 2018).

São os colonizadores primários do grupo dos estreptococos as espécies *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mutans*, por exemplo. Embora *Streptococcus mutans* não seja frequentemente um colonizador primário, tal espécie tem papel importante no processo de desenvolvimento do biofilme cariogênico (Montelongo-Jauregui e Lopez-Ribot, 2018). A espécie produz glucosiltransferases que catalisam a síntese de glucanos extracelulares insolúveis a partir dos açúcares (Stipp et al., 2008).

*Candida* spp., e em particular *Candida albicans* tem sido descrita na literatura por interagir com outros membros da microbiota oral, inclusive *Streptococcus mutans* (Montelongo-Jauregui e Lopez-Ribot, 2018). A interação entre essas duas espécies foi descrita em estudo realizado por (Hwang et al., 2015) que demonstrou que a glucosiltransferase B (GtfB) produzida por *Streptococcus mutans* pode se ligar diretamente à superfície de *Candida albicans* permitindo a adesão às superfícies dentárias e levando à formação de biofilmes mistos. Além disso, a interação de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em biofilme oral pode aumentar a produção de exopolissacarídeos na matriz extracelular, resultando em aumento da biomassa do

biofilme e induzir a expressão de genes de virulência por *Streptococcus mutans*. Sendo assim, a relação simbiótica entre essas duas espécies pode aumentar a virulência do biofilme contribuindo para a patogênese da cárie (Falsetta et al., 2014).

## **2.2 Tratamento antifúngico de *Candida* spp.**

Para o tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida*, os principais antifúngicos utilizados são fármacos pertencentes a 3 classes: os polienos, os azóis e as equinocandinas (Ben-Ami, 2018; Nguyen e Yu, 1995; Steinbach et al., 2005). De forma geral, na maioria dos casos clínicos, os azóis e equinocandinas são utilizados como primeira linha de tratamento e os polienos como segunda linha de tratamento. No entanto, deve-se levar em conta para cada caso a espécie causadora da infecção e suas características como susceptibilidade do microrganismo ao fármaco escolhido para terapia, efeitos colaterais do fármaco, idade, condições imunológicas do paciente, entre outras particularidades de cada caso (Nami et al., 2019; Arendrup e Patterson, 2017).

Apesar das opções de tratamento já disponíveis, *Candida* spp. tem apresentado resistência a tais antifúngicos. A resistência pode ser sem exposição prévia do microrganismo ao antifúngico ou pode ser adquirida, a qual o microrganismo previamente susceptível após um período de exposição, torna-se resistente (Silva et al., 2012).

Os azóis são um grupo de compostos antifúngicos com ampla atividade contra a maioria das espécies de *Candida*. Fazem parte dessa classe de antifúngicos fluconazol, itraconazol, isavuconazol, posaconazol e voriconazol (Silva et al., 2012; Nami et al., 2019). Esses antifúngicos atuam inibindo o lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, uma enzima importante na formação do ergosterol, componente da membrana celular fúngica (Pappas et al., 2018; Hitchcock et al., 1990). Dentro dessa classe de antifúngicos, o fluconazol é o principal fármaco utilizado (Ben-Ami, 2018). No entanto, as espécies *Candida glabrata* (Pfaller e Diekema, 2007; Pfaller et al., 2005) e *Candida krusei* (Nami et al., 2019) tem apresentado resistência aos azóis.

Outra classe de antifúngicos são as equinocandinas representada pelos compostos anidulafungina, caspofungina e micafungina (Pappas et al., 2018). Tais

antifúngicos atuam inibindo a síntese de 1,3-  $\beta$ - glucano, componente da parede celular fúngica. Esses fármacos são amplamente utilizados contra diversas espécies de *Candida*, incluindo espécies que apresentam resistência ou tolerância aos azóis (Nami et al., 2019). As espécies *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* (Pfaller et al., 2007) tem apresentado resistência às equinocandinas (Pfaller et al., 2005).

Os polienos são compostos antifúngicos que se ligam a esteróis, especialmente o ergosterol, da membrana plasmática formando poros e resultando no vazamento de conteúdo intracelular e posterior morte do microrganismo (Bem-Ami, 2018). A anfotericina B é geralmente considerada um antifúngico de amplo espectro e é utilizada em casos de infecções graves. A resistência à anfotericina B é menos comum, porém *Candida lusitanae* e *Candida glabrata* são espécies que tem sido relatadas por apresentar resistência a esses fármacos (Nami et al., 2019).

### **2.3 *Mentha* spp. como fonte de compostos antifúngicos**

Atualmente a resistência de microrganismos a tratamentos antimicrobianos já disponíveis no mercado tem resultado na busca por novas fontes alternativas de controle desses microrganismos. Nesse contexto, as plantas medicinais tem sido estudadas, pois são ricas em biocomponentes responsáveis por diversas atividades biológicas (Höfling et al., 2010).

Na literatura em particular as plantas pertencentes ao gênero *Mentha* tem sido amplamente estudadas e os compostos presentes no óleo essencial de tais plantas são descritos por possuir atividade anti-inflamatória (Battistin et al., 2011), antioxidante, antibacteriana, antiviral e antifúngica (Saharkhiz et al., 2012; Dukic et al., 2003; Íscan et al., 2002; Singh et al., 2011; Melzer et al., 2004).

Em relação a atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *Mentha piperita* tem demonstrado ação contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* (Valeriano et al., 2012). Dukic et al. (2003) mostram em estudo que o óleo essencial de *Mentha aquática* possui ação antifúngica contra as espécies de fungos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*,

*Microsporium canis* e *Epidermophyton floccosum*. Em estudo feito por Mkaaddem et al. (2009) demonstrou que o óleo essencial de *Mentha longifolia* possui ação antifúngica contra *Aspergillus* spp.

Os compostos isolados obtidos a partir do óleo essencial de espécies de *Mentha* também tem apresentado atividade antimicrobiana. Carvona apresentou ação antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Trichophyton rubrum* (Aggarwal et al., 2001). Mentona apresentou atividade antifúngica sobre *Aspergillus niger* (Moghtader, 2013). Carvona e mentona apresentam ação antifúngica sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* spp. (Hussain et al., 2010). Abolfazl et al., 2014 mostraram que mentona e mentofurano possuem ação antimicrobiana sobre *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em estudo feito por Arruda et al. (2006), pulegona apresentou ação antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*.

Os resultados descritos na literatura da ação antimicrobiana de biocomponentes presentes no óleo essencial de *Mentha* spp. mostram a importância de estudos com essas plantas e podem trazer resultados promissores à saúde pública no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos que atuem contra espécies resistentes.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antifúngica dos compostos carvona, mentona, mentofurano e pulegona, isolados e em associação em espécies de *Candida* e no biofilme duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

Objetivos específicos do estudo:

- 1) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos isolados e em associação sobre espécies de *Candida*;
- 2) Classificar a ação dos compostos em combinação pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF);
- 3) Analisar em citômetro de fluxo células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 após o tratamento com os compostos isolados;
- 4) Analisar em Microscópio Eletrônico de Transmissão a ação dos compostos isolados e em associação sobre a morfologia de *Candida albicans* ATCC MYA-2876;
- 5) Verificar a ação dos compostos isolados e em associação na biomassa do biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876;
- 6) Verificar a ação dos compostos isolados e em associação na biomassa do biofilme em formação duo-espécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de Pesquisa

As análises experimentais foram realizadas utilizando as estruturas da Área de Microbiologia e Imunologia, Centro de Microscopia e Imagem (CMI) e a Área da Patologia Oral– Departamento de Diagnóstico Oral – FOP/UNICAMP, Piracicaba – São Paulo.

### 4.2 Compostos

Para os ensaios, foram utilizados os compostos isolados carvona (referência: 124931, lote: MKBQ5186), mentona (referência: 95401, lote: BCBM3599V), mentofurano (referência: 63661, lote: BCBN1819V) e pulegona (referência: 55708, lote: 07013MB). Com os compostos, foram formadas as combinações:

- 1) carvona e mentona
- 2) carvona e mentofurano
- 3) carvona e pulegona
- 4) mentona e mentofurano
- 5) mentona e pulegona
- 6) mentofurano e pulegona

Como controle, nos ensaios de microdiluição em caldo, foi utilizado o antifúngico comercial Fluconazol. Os compostos isolados e o Fluconazol foram adquiridos comercialmente da empresa *Sigma Aldrich*.

### 4.3 Diluição dos compostos

Para todos os ensaios, os compostos foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 e Tween 80% (0,05%). Para os ensaios de biofilme duo-espécie os compostos foram diluídos em Caldo triptona Soja (TSB) e Tween 80 (0,05%). O antifúngico comercial Fluconazol foi diluído em água destilada. Foram feitos controles negativos.

### 4.4 Microrganismos

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

- Cepas padrão: *Candida krusei* (CBS 573), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (ATCC MYA-2876), *Candida guilliermondii* (CBS 566), *Candida tropicalis* (CBS 74), *Candida parapsilosis* (CBS 604) e *Candida dubliniensis* (CBS 7987). (CBS- *Centraalbureau voor Schimmelcultures*; ATCC: *American Type Culture Collection*);
- Isolados clínicos de cavidade e prótese oral: *Candida albicans* (330), *Candida albicans* (378) e *Candida albicans* (335). Os isolados clínicos provém da cavidade bucal e/ou próteses dentárias de pacientes que receberam atendimento odontológico na Clínica de Prótese da Faculdade de Odontologia de Alfenas, da Universidade de Alfenas. Tais isolados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo (Projeto Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Protocolo nº 150/15);

Para os ensaios com biofilme duo-espécie foi utilizada a cepa *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

Todas as cepas foram mantidas no laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da FOP/UNICAMP.

#### 4.5 Determinação da CIM e ICIF sobre *Candida* spp.

##### 4.5.1 Padronização do inóculo

As cepas foram inicialmente transferidas do estoque em glicerol e meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) mantido sob refrigeração (-20°C), para caldo YPD. Posteriormente foram incubadas em estufa de aerobiose a 37° C durante 24 horas. Após, as cepas foram transferidas para o meio de cultura SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) e incubadas em estufa de aerobiose a 37° C durante 24 horas a fim de reativar as cepas para uso. Para o ensaio da avaliação da CIM, o inóculo foi ajustado em solução salina (0,9%) com absorbância de 530 nm = 0,08 a 0,10, ou aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL no espectrofotômetro, seguida de diluições 1:10 em solução salina (0,9%) e 1:20 em RPMI. O inóculo foi padronizado a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL, seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008).

##### 4.5.2 Método de microdiluição em caldo

As amostras de *Candida* spp. foram analisadas quanto a sensibilidade aos compostos isolados e em associação. Para os compostos isolados a concentração inicial testada foi de 16 mg/ml e para os ensaios dos compostos em associação a concentração inicial foi a CIM obtida nos ensaios com os compostos isolados. Como controle positivo foram feitos experimentos com o antifúngico comercial Fluconazol nas concentrações de 64- 0,00125 µg/mL.

Os ensaios com compostos isolados foram feitos em microplaca (Global Trade) estéril de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio de cultura RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*®). Após, foi adicionado 100 µL dos compostos isolados na concentração desejada e feita diluição seriada de forma que a concentração fosse caindo pela metade. Posteriormente, foram adicionados aos compartimentos da placa 100 µL de inóculo ajustado na concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas em 37 °C em estufa de aerobiose.

Os ensaios com compostos em associação também foram realizados em microplaca (Global Trade) estéril de 96 poços foram adicionados 50 µL de meio de cultura RPMI-1640 (*Sigma Aldrich*®). Após, foi adicionado 50 µL dos composto A e feita diluição seriada. Posteriormente foram adicionados 50 µL do composto B já diluído (em microtubos) nas concentrações desejadas. Foi adicionado aos compartimentos da placa 100 µL de inóculo ajustado na concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas, 37° C em estufa de aerobiose.

Após o período de incubação, foi feita leitura visual das placas para determinar a CIM. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível da levedura. Foram feitos 3 experimentos independentes.

#### 4.5.3 Classificação da combinação dos compostos pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)

A combinação das menores concentrações dos compostos que inibiram o crescimento visível da levedura foi analisada utilizando o Índice de Concentração Inibitória Fracionaria (ICIF) para classificar as interações entre as substâncias testadas. O ICIF foi calculado:

$$\frac{\text{CIM da substância A combinada} + \text{CIM da substância B combinada}}{\text{CIM da substância A isolada} \quad \text{CIM da substância B isolada}}$$

O resultado obtido foi classificado como sinergismo  $FICI < 0,5$ ; antagonismo  $FICI > 4,0$ ; sem interação  $FICI > 0,5$  e  $< 4,0$  (Odds 2003).

#### 4.6 Ação dos compostos na célula analisada sob Citômetro de Fluxo

As células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foram analisadas quanto a integridade da membrana celular, potencial de membrana citoplasmática e a presença de espécies reativas ao oxigênio. As células ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) foram cultivadas por 16 horas na presença dos compostos isolados nas concentrações sub-CIM (carvona e pulegona: 1mg/ml; mentona: 4mg/ml; mentofurano: 2mg/ml) e sub-biofilme (0,5 mg/ml para carvona, mentona e pulegona; 0,125 mg/ml para mentofurano). Após, foram tratadas com os fluorocromos: IP (Iodeto de Propídio), (0,5  $\mu$ l para 500  $\mu$ l de inóculo), DiOC<sub>6</sub>(3) (0,5  $\mu$ l para 500  $\mu$ l de inóculo) e DHR-1,2,3 (20  $\mu$ l para 500  $\mu$ l de inóculo). A amostra foi incubada por 15 minutos na ausência de luz, fixadas com solução de 3% de paraformaldeído (Freitas et al., 2013). Todas amostras foram lidas por Citômetro de Fluxo obtendo-se 10.000 eventos para cada experimento independente. Os marcadores foram utilizados em experimentos separados, a fim de não haver interferência de fluorescência nos canais do equipamento. Os comprimentos de onda utilizados foram diferentes para cada fluorocromo. IP teve excitação a 536 nm e emissão a 623 nm (FL2). DiOC<sub>6</sub>(3) teve excitação a 484nm e emissão a 501 nm (FL1). O marcador DHR-1,2,3 teve excitação a 500 nm e emissão a 536 nm (FL1). Como controle, além dos grupos de tratamento com os compostos, foram analisadas células não coradas, que serviram de controle da autofluorescência. Foram feitos 2 experimentos independentes em duplicata.

O aparelho utilizado foi Facscalibur BD do Departamento de Diagnóstico Oral, Área de Patologia da FOP- UNICAMP).

#### 4.7 Análise da ação dos compostos na morfologia celular sob Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

Para visualizar pelo MET alterações morfológicas após o tratamento com os compostos, células de *Candida albicans* MYA-2876 foram cultivadas *overnight* em SDA. Após, foram ajustadas a  $1 \times 10^6$  UFC/mL e incubadas com os compostos nas concentrações sub-biofilme, sendo 0,5 mg/ml para carvona, mentona e pulegona; 0,125 mg/ml para mentofurano. Estas concentrações em análises anteriores, inibiram aproximadamente 50% a atividade metabólica do biofilme da espécie. Foram testados

também, os compostos em associação: carvona (0,0009 mg/ml) e pulegona (0,0625 mg/ml); carvona (0,0009 mg/ml) e mentona (0,1250 mg/ml); e mentona (0,0625 mg/ml) e pulegona (0,0009 mg/ml). Após incubação de 24 horas, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 2.000 G (centrífuga *ependorf*) para a formação de *pellets*. Os *pellets* foram lavados com PBS (1x), ressuspensos em Karnovsky (0,1M) por 36 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão fosfato Sorensen, fixadas com tetróxido de ósmio por 4 horas em temperatura ambiente. Novamente as amostras foram lavadas com tampão fosfato Sorensen e em seguida desidratadas com concentrações crescentes de acetona PA (Merck) (30%, 50%, 70%, 90% por 5 minutos cada). Para finalizar, as amostras foram infiltradas em resina Dr. Spurr nas concentrações 3:1, 1:1, 1:3, resina pura por 2 horas e polimerizadas em resina pura durante 48 horas em estufa de 60 a 70° C. Após polimerizadas as amostras foram cortadas em ultramicrótomo, contrastadas com chumbo e uranila e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão, JEM 1400 JEOL (Roque et al., 2015).

#### 4.8 Análise dos compostos na biomassa do biofilme.

##### 4.8.1 Análise da ação dos compostos no biofilme uniespécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876

Para avaliar a ação dos compostos na biomassa do biofilme de *Candida albicans* MYA-2876 foi cultivada em placa SDA *overnight*, e colônias foram transferidas para caldo de YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) sob agitação a 180 rpm e 30°C. Alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada e lavada 2x com PBS e acrescido de 7ml de RPMI-1640 a 37°C. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, e as células foram ajustadas com o auxílio da câmara de Neubauer, microscópio óptico (aumento de 400x) e o volume calculado a partir da contagem. A suspensão final continha  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, em RPMI-1640.

Para o biofilme em formação, o inóculo ajustado foi distribuído em microplaca e pré-incubado por 2 horas sob agitação. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e os tratamentos com os compostos foram adicionados sobre o biofilme. O espécime foi incubado por 24 horas em estufa de aerobiose (Silva et al., 2010).

Para o biofilme maduro, o inóculo ajustado foi distribuído em microplaca e incubado em estufa de aerobiose à 37°C por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura

foi aspirado e os tratamentos com os compostos foram adicionados sobre o biofilme. O espécime foi incubado nas mesmas condições atmosféricas (Pierce et al., 2008).

Ambos os biofilmes foram tratados com concentrações decrescentes dos compostos, ou seja, a partir da concentração inicial as concentrações foram caindo pela metade. A concentração inicial utilizada para carvona foi de 2 mg/ml, para mentona foi de 8 mg/ml, para mentofurano foi de 4 mg/ml e para pulegona foi de 2 mg/ml. A concentração inicial utilizada dos compostos em associação foram: Combinação 1 (carvona: 0,0036 mg/ml e mentona: 0,5000 mg/ml); Combinação 2 (carvona: 0,0664 mg/ml e mentofurano: 0,0076 mg/ml); Combinação 3 (carvona: 0,0036 mg/ml e pulegona: 0,2500 mg/ml); Combinação 4 (mentona: 0,0156 mg/ml e mentofurano: 4 mg/ml); Combinação 5 (mentona: 0,2500 mg/ml e pulegona: 0,0036 mg/ml) e Combinação 6 (pulegona: 0,0036 mg/ml e mentofurano: 1,2500 mg/ml). Foram feitos 3 experimentos independentes.

Para a quantificação do Biofilme, após o período de incubação, os biofilmes foram lavados, corados com Cristal Violeta (0,1%) e a biomassa foi mensurada a 575 nm em espectrofotômetro de microplacas. Foram considerados os resultados com mínimo de 50% de inibição da progressão da biomassa do biofilme em formação e 50% de desconstrução da biomassa do biofilme maduro.

#### 4.8.2 Análise da ação dos compostos no biofilme duo-espécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610

As células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foram incubadas *overnight* em SDA, estufa de aerobiose 37°C. Colônias foram transferidas para caldo YPD sob agitação a 180 rpm e 30°C. Alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada e lavada 2x com PBS e acrescido de 7ml de meio de cultura TSB. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, e as células foram ajustadas com o auxílio da câmara de Neubauer, microscópio óptico (aumento de 400x) e o volume calculado a partir da contagem. A suspensão final continha  $2 \times 10^7$  UFC/mL.

As células de *Streptococcus mutans* ATCC 700610 foram incubadas *overnight* em BHI ágar, estufa de aerobiose com 10% CO<sub>2</sub> à 37°C. Colônias foram transferidas para caldo BHI sob agitação a 180 rpm e 37°C. Alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada e lavada 2x com PBS e acrescido de 7ml de meio de cultura TSB. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, e as células foram ajustadas com o auxílio da câmara de Neubauer, microscópio óptico

(aumento de 400x) e o volume calculado a partir da contagem. A suspensão final continha  $2 \times 10^8$  UFC/mL em meio de cultura TSB.

Em microplacas de 96 poços (Global Trade), foram colocados 100  $\mu$ L do inóculo ajustado de cada espécie. As placas foram incubadas em estufa de aerobiose com 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 horas para promover a adesão celular. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado, e a placa lavada (1x) com PBS (1x), a fim de remover células não aderentes. Em seguida foram adicionados 200  $\mu$ L dos tratamentos diluídos em meio de cultura TSB com 0,05% de TWEEN 80. A concentração inicial testada foi de 8 mg/ml para cada composto isolado e combinações. A placa foi novamente incubada por 24 horas à 37°C em estufa de aerobiose com 10% de CO<sub>2</sub> (Fernandes et al., 2016).

Após o período de incubação, os biofilmes foram quantificados da mesma forma que no item 4.8.1.

#### 4.8.3 Estatística

Para a análise estatística dos biofilmes foi utilizado o teste de *Dunnett*, ANOVA ( $P < 0,05$ ), Programa Biostat 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação da CIM e ICIF sobre *Candida* spp.

Todos os compostos isolados e em associação apresentaram ação antifúngica nas células planctônicas de *Candida* spp. em diferentes concentrações. Os compostos isolados inibiram o crescimento das cepas em concentrações de 0,5 a 8 mg/ml e a ação mais efetiva foi por parte do composto carvona sobre o isolado clínico *Candida albicans* 378, o qual inibiu o crescimento da cepa na concentração de 0,5 mg/ml. De acordo com o ICIF, a associação entre os compostos apresentou sinergismo sobre as cepas testadas. Foram exceções as cepas clínicas *Candida albicans* 330 e 335 nas combinações 1 e 3, pois não houve interação entre os compostos. O mesmo ocorreu com a combinação 1 para as cepas *Candida parapsilosis* CBS 604 e *Candida guilliermondii* CBS 566, não apresentando interação entre os compostos. Para o isolado clínico *Candida albicans* 378 não houve interação dos compostos para as combinações 2 e 3. Nenhuma das combinações testadas apresentou efeito antagonista. Os ensaios com o fluconazol apresentaram valores de inibição entre 0,25 a 8 µg/mL. Os resultados estão expressos na Tabela 1. A classificação das combinações pelo ICIF estão expressas na tabela 2. As concentrações dos compostos em associação que inibiram o crescimento de *Candida* spp. estão descritas na Tabela 3.

Tabela 1: Perfil de sensibilidade das cepas de *Candida* após tratamentos.

Cepas	Carvona mg/ml	Mentona mg/ml	Mentofurano mg/ml	Pulegona mg/ml	Fluconazol µg/ml
Ck	2	8	4	1	8
Ca90028	2	8	4	2	0,5
Ca2876	2	8	4	2	0,5
Cg	1	4	4	1	0,5
Ct	2	8	8	2	0,5
Cp	1	8	4	1	1
Cd	2	8	4	1	0,5
Ca330	1	8	8	1	0,5
Ca378	0,5	8	4	1	0,25
Ca335	1	8	4	1	1

Ck: *Candida krusei*; Ca90028: *Candida albicans* 90028; Ca2876: *Candida albicans* 2876; Cg: *Candida guilliermondii*; Ct: *Candida tropicalis*; Cp: *Candida parapsilosis*; Cd: *Candida dubliniensis*; Ca330: *Candida albicans* 330; Ca378: *Candida albicans* 378; Ca335: *Candida albicans* 335.

Tabela 2: Classificação pelo ICIF

Carvona e mentona	Carvona e mentofurano	Carvona e pulegona	Mentona e mentofurano	Mentona e pulegona	Mentofurano e pulegona
S	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S
S/I	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S
S/I	S	S	S	S	S
S	S	S	S	S	S
S/I	S	S/I	S	S	S
S	S/I	S/I	S	S	S
S/I	S	S/I	S	S	S

S: sinergismo; S/I: sem interação.

Tabela 3: Concentrações (mg/ml) dos compostos em associação que inibiram o crescimento de *Candida* spp.

Cepas	1	2	3	4	5	6
<i>C. krusei</i> CBS 573	C:0,0009 M: 0,0625	C:0,125 MF: ,0019	C: 0,0009 P: 0,125	M:0,0039 MF: 0,25	M:0,0625 P: 0,0009	MF: 0,5 P: 0,001
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	C:0,0009 M: 0,125	C: 0,0166 MF: 0,0019	C: 0,0009 P: 0,0625	M:0,0039 MF: 1	M: 0,0625 P: 0,0009	P: 0,0009 MF:0,3125
<i>C. albicans</i> ATCC 2876	C:0,0009 M: 0,125	C: 0,0166 MF: 0,0019	C: 0,0009 P: 0,0625	M:0,0039 MF: 1	M: 0,0625 P: 0,0009	P: 0,0009 MF:0,3125
<i>C. guilliermondii</i> CBS 566	C: 0,0019 M: 4	C: 0,078 MF: 1	C: 0,0019 P: 1	M: 0,0039 MF: 2	P:0,0019 M: 1	MF: 1 P: 0,0009
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	C:0,0009 M: 0,125	C: 0,0166 MF: 0,0019	C: 0,0009 P: 0,0625	M:0,0039 MF: 1	M: 0,0625 P: 0,0009	P: 0,0009 MF:0,3125
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	C: 0,0019 M: 4	C:0,125 MF:0,0009	C: 0,0009 P:0,25	M: 0,0039 MF: 2	MF:0,5 P: 0,0009	MF: 1 P: 0,0009
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	C:0,0009 M: 0,0625	C:0,125 MF: ,0019	C: 0,0009 P: 0,125	M:0,0039 MF: 0,25	M:0,0625 P: 0,0004	MF: 0,5 P: 0,001
<i>C. albicans</i> 330 (Isolado clínico)	C: 0,0019 M: 4	C: 0,078 MF: 1	C: 0,0019 P: 1	M: 0,0039 MF: 2	P:0,0019 M: 1	MF: 1 P: 0,0009
<i>C. albicans</i> 378 (Isolado clínico)	C: 0,0019 M: 2	C: 0,039 MF: 4	C: 0,0019 P: 0,5	M: 0,0039 MF: 1	M: 0,0625 P: 0,0039	MF: 0,25 P: 0,125
<i>C. albicans</i> 335 (Isolado clínico)	C: 0,0019 M: 4	C: 0,078 MF: 1	C: 0,0019 P: 1	M: 0,0039 MF: 2	M:0,0625 P: 0,0004	MF: 1 P: 0,0009

Combinação 1: carvona e mentona; Combinação 2: carvona e mentofurano; Combinação 3: carvona e pulegona; Combinação 4: mentona e mentofurano; Combinação 5: mentona e pulegona; Combinação 6: pulegona e mentofurano.

## 5.2 Ação dos compostos em *Candida albicans* MYA 2876 sob Citômetro de Fluxo

Nesse ensaio, as células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foram analisadas, quanto ao seu comportamento e complexidade interna, como integridade da membrana citoplasmática, potencial de membrana citoplasmática e a presença de espécies reativas ao oxigênio após tratamento com os compostos. As células tratadas apresentaram baixa marcação para o Iodeto de Propídeo, entre 2,11% e 11,47%,

sendo que o composto mentona e mentofurano nas concentrações sub-biofilme não apresentaram marcação, indicando que os compostos não rompem a parede celular das células nas concentrações testadas. Já para DIOC6 as células apresentaram marcação entre 97,71% e 99,03%, indicando despolarização da membrana após o tratamento com os compostos. Com o marcador DHR-1,2,3, que permite monitorar a presença de espécies reativas de oxigênio, as células apresentaram marcações entre 7,05% e 43,08%, indicando que os tratamentos formaram ROS dose-dependente. Os resultados estão expressos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 4: Dados obtidos em citômetro de fluxo de *Candida albicans* MYA 2876 após tratamento com os compostos (tratamentos na concentração Sub-CIM)

Marcador	Controle	Cont. Int.	carvona	mentona	mentofurano	pulegona
IP	2,17%	94,725%	6,5%	11,47%	3,14%	5,62%
DIOC <sub>6</sub>	0,97%	99,93 %	98,97%	99%	99,03%	98,97%
DHR1,2,3	0,37%	86,61%	30,33%	43,08%	20,49%	18,89%

Cont Int: Controle de Internalização do corante

Tabela 5: Dados obtidos no citômetro de fluxo de *Candida albicans* MYA 2876 após tratamento com os compostos (tratamentos na concentração Sub-biofilme)

Marcador	Controle	Cont. Int.	carvona	mentona	mentofurano	pulegona
IP	2,17%	94,725%	2,11%	-	-	5,62%
DIOC <sub>6</sub>	0,97%	99,93%	99,02%	99,02%	97,71%	99,01%
DHR1,2,3	0,37%	86,61%	7,05%	26,09%	18,48%	20,91%

Cont Int: Controle de Internalização do corante; - Não houve marcação.

### 5.3 Análise da ação dos compostos na morfologia celular analisada sob Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)

As imagens obtidas em Microscópio Eletrônico de Transmissão das células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 tratadas com os compostos isolados e em associação evidenciaram alterações celulares quando comparadas ao controle sem os tratamentos.

No controle sem os tratamentos foi observada integridade celular, com membrana citoplasmática e parede celular bem delimitadas (Figura 1).

O tratamento com o composto carvona (Figura 2) apresentou retração do conteúdo citoplasmático e formação de vacúolos no citoplasma. Já o tratamento com mentona (Figura 3), foi observado a formação de vacúolos em todas as células. Algumas células apresentaram alterações na membrana citoplasmática porém não

foram dados representativos pois tais alterações não foram visualizadas em todas as células. O tratamento com mentofurano (Figura 4) evidenciou irregularidades na membrana citoplasmática, como a formação de ondulações. Já as células tratadas com pulegona (Figura 5) apresentaram retração citoplasmática, vacúolos intracelulares e membrana citoplasmática com rugosidades.

Os tratamentos com os compostos em associação também apresentaram alterações celulares. A combinação de carvona e pulegona (Figura 6) resultou na formação de vacúolos em todas as células e alterações na membrana citoplasmática, sendo que em alguns locais ela parece estar aderida à parede celular. O tratamento com a combinação de carvona e mentona (Figura 7) resultaram em danos a célula, como retração citoplasmática e formação de vacúolos. Já o tratamento com a combinação de mentona e pulegona (Figura 8) foram observados vacúolos com conteúdo escuro.

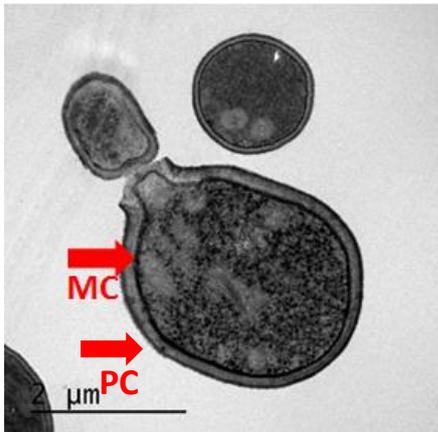


Figura 1: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do controle de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 sem o tratamento com os compostos. PC: parede celular; MC: membrana citoplasmática.

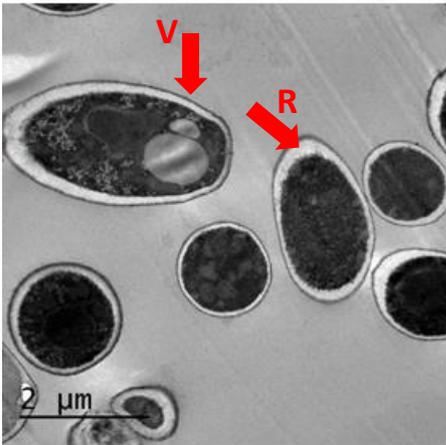


Figura 2: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com carvona. R: retração do conteúdo citoplasmático; V: vacúolos.

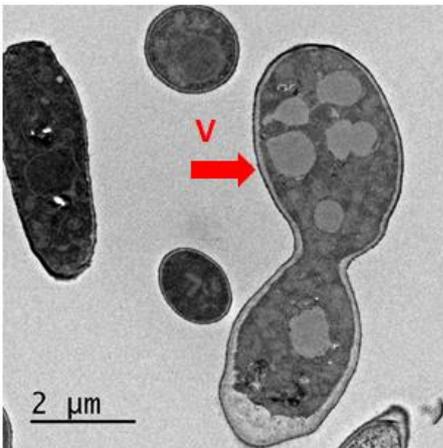


Figura 3: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com mentona. V: vacúolos.

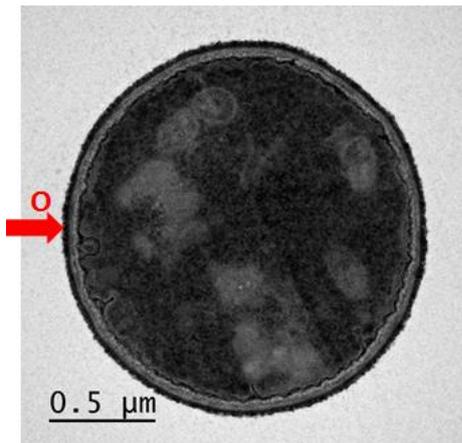


Figura 4: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com mentofurano. O: ondulações.

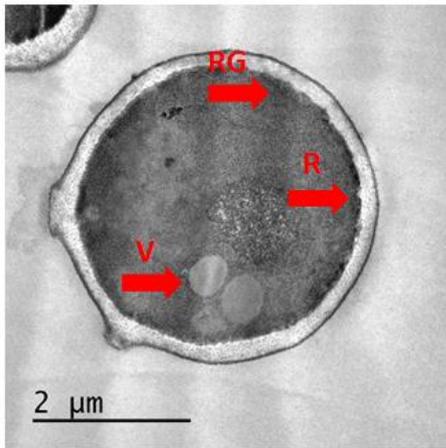


Figura 5: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com pulegona. RG: rugosidades; R: retração do conteúdo citoplasmático; V: vacúolos.

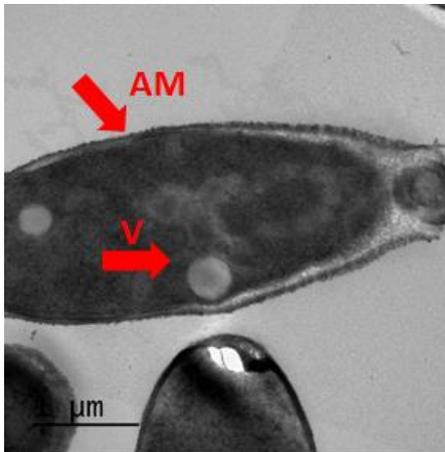


Figura 6: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com a associação de carvona e pulegona. AM: alterações da membrana citoplasmática. A membrana parece estar aderida a parede celular. V: vacúolo.

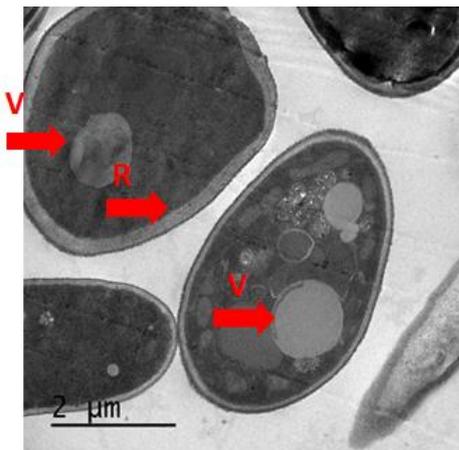


Figura 7: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com a associação de carvona e mentona. R: retração do conteúdo citoplasmático; V: vacúolo.

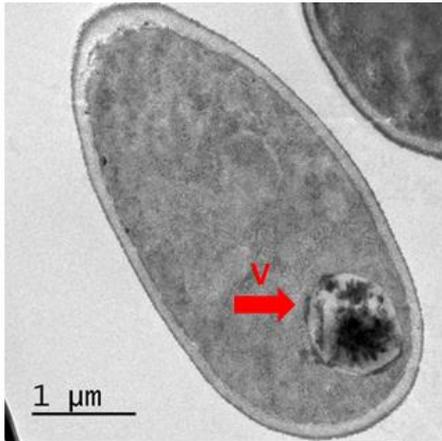


Figura 8: Imagem obtida por Microscópio Eletrônico de Transmissão do tratamento de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 com a associação de mentona e pulegona. V: vacúolo.

#### 5.4 Análise da ação dos compostos no biofilme uniespécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876

Os compostos isolados e em associação foram testados no biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 para avaliar a ação dos tratamentos na biomassa dos biofilmes. No biofilme em formação, carvona impediu a progressão do biofilme em 63% comparado ao controle na concentração de 2 mg/ml ([1]). Pulegona impediu a progressão do biofilme em 83% comparado ao controle na concentração de 2 mg/ml ([1]). Mentona e mentofurano não impediram a progressão do biofilme em 50% ou mais comparado ao controle em nenhuma concentração testada (Figuras 9 e 10). No biofilme maduro, nenhum dos compostos ou combinações desconstruíram a biomassa do biofilme em 50% comparado ao controle nas concentrações testadas (Figuras 11 e 12).

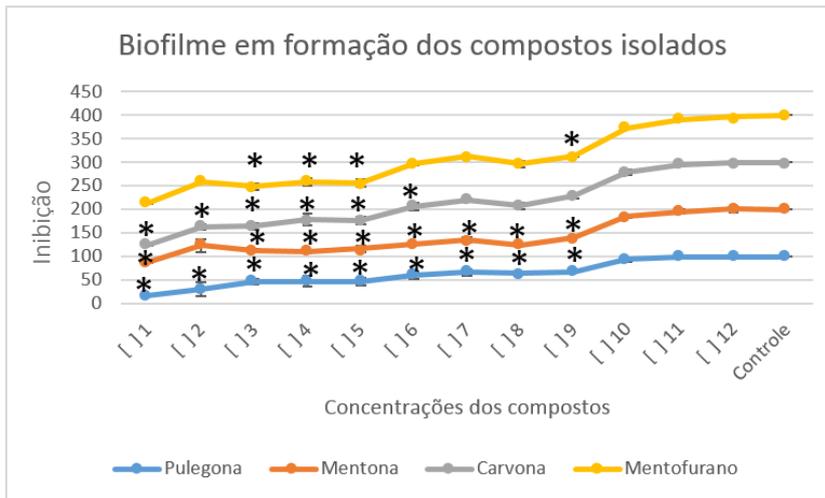


Figura 9: Gráfico da ação dos compostos isolados na biomassa do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA 2876. Concentração inicial ([ ]1): carvona: 2 mg/ml; mentona: 8 mg/ml; mentofurano: 4 mg/ml; pulegona: 2 mg/ml. \*  $P < 0,05$ .

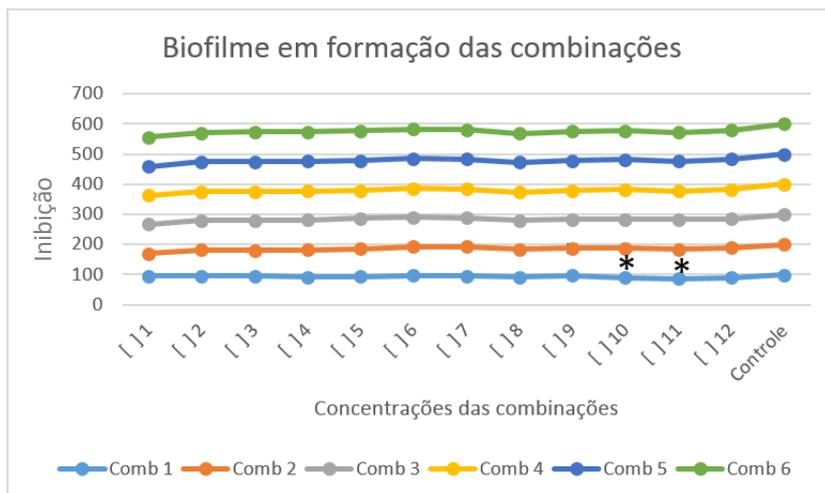


Figura 10: Gráfico da ação dos compostos em associação na biomassa do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA 2876. Concentração inicial ([ ]1): Combinação 1 (carvona: 0,0036 mg/ml e mentona: 0,5 mg/ml); Combinação 2 (carvona: 0,0664 mg/ml e mentofurano: 0,0076 mg/ml); Combinação 3 (carvona: 0,0036 mg/ml e pulegona: 0,025 mg/ml); Combinação 4 (mentofurano: 0,0156 mg/ml e mentona: 4 mg/ml); Combinação 5 (mentona: 0,25 mg/ml e pulegona: 0,0036 mg/ml) e Combinação 6 (pulegona: 0,0036 mg/ml e mentofurano: 1,25 mg/ml). \*  $P < 0,05$ .

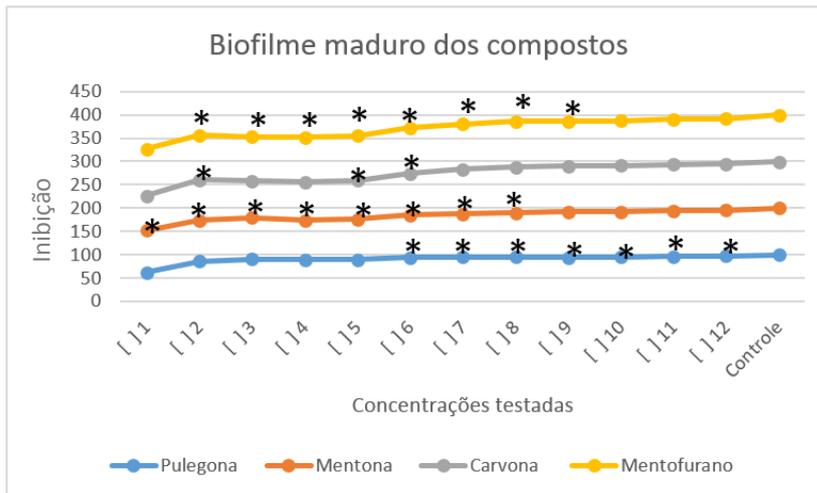


Figura 11: Gráfico da ação dos compostos isolados na biomassa do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA 2876. Concentração inicial ([ ]1): carvona: 2 mg/ml; mentona: 8 mg/ml; mentofurano: 4 mg/ml; pulegona: 2 mg/ml. \*  $P < 0,05$ .

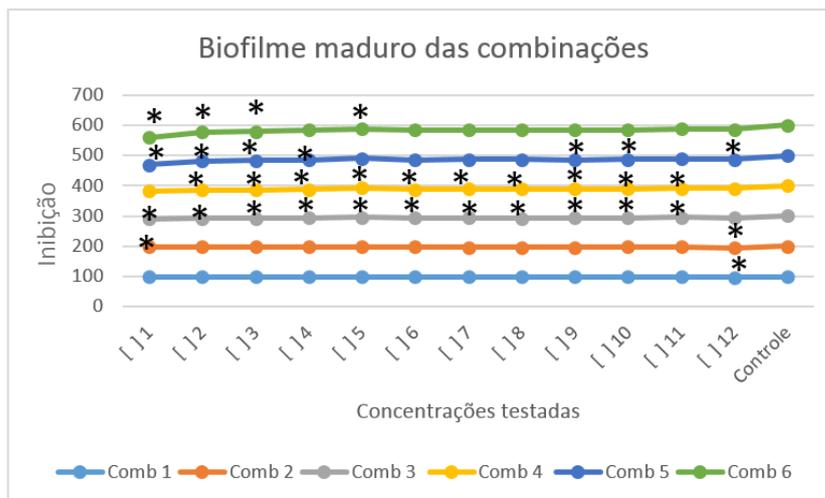


Figura 12: Gráfico da ação dos compostos em associação na biomassa do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA 2876. Concentração inicial ([ ]1): Combinação 1 (carvona: 0,0036 mg/ml e mentona: 0,5 mg/ml); Combinação 2 (carvona: 0,0664 mg/ml e mentofurano: 0,0076 mg/ml); Combinação 3 (carvona: 0,0036 mg/ml e pulegona: 0,025 mg/ml); Combinação 4 (mentofurano: 0,0156 mg/ml e mentona: 4 mg/ml); Combinação 5: (mentona: 0,25 mg/ml e pulegona: 0,0036 mg/ml) e Combinação 6 (pulegona: 0,0036 mg/ml e mentofurano: 1,25 mg/ml). \*  $P < 0,05$ .

### 5.5 Análise da ação dos compostos no biofilme duo-espécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610

Os compostos isolados e em associação foram testados no biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610 para avaliar a ação dos tratamentos na biomassa do biofilme. Carvona

impediu a progressão em 79% comparado ao controle na concentração de 8 mg/ml ([1] 1). Pulegona impediu a progressão da biomassa em 60% comparado ao controle na concentração de 8 mg/ml. Os outros compostos não impediram a progressão do biofilme em 50% ou mais comparado ao controle em nenhuma concentração testada (Figuras 13 e 14).

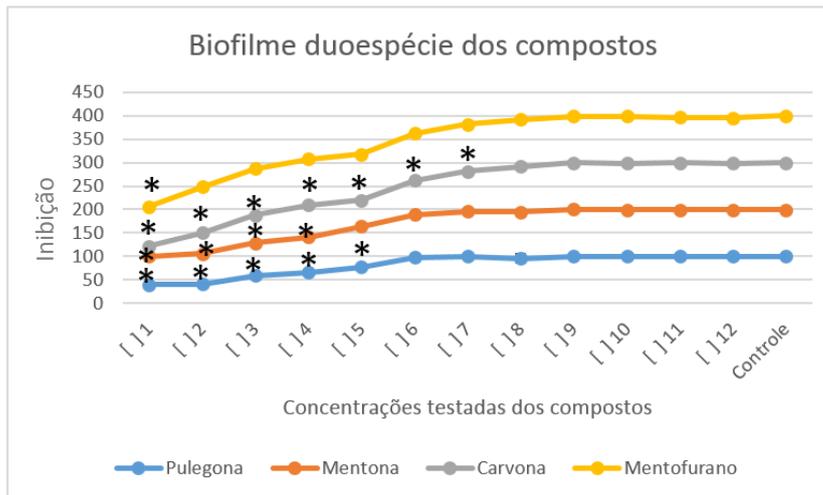


Figura 13: Gráfico da ação dos compostos isolados na biomassa do biofilme em formação do biofilme duo-espécie. Concentração inicial ([1]1): carvona: 8 mg/ml; mentona: 8 mg/ml; mentofurano: 8 mg/ml; pulegona: 8 mg/ml. \*  $P < 0,05$ .

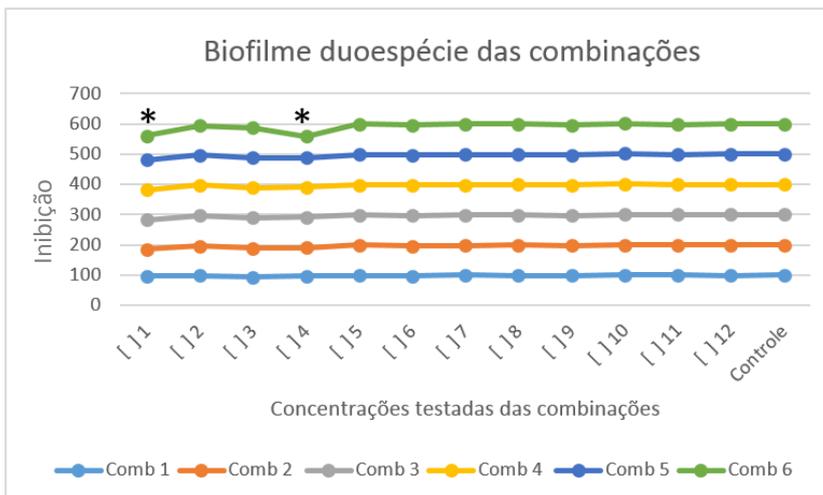


Figura 14: Gráfico da ação dos compostos em associação na biomassa do biofilme maduro de *Candida albicans* ATCC MYA 2876. Concentração inicial ([1]1): Combinação 1 (carvona: 8 mg/ml e mentona: 8 mg/ml); Combinação 2 (carvona: 8 mg/ml e mentofurano: 8 mg/ml); Combinação 3 (carvona: 8 mg/ml e pulegona: 8 mg/ml); Combinação 4 (mentofurano: 8 mg/ml e mentona: 8 mg/ml); Combinação 5 (mentona: 8 mg/ml e pulegona: 8 mg/ml) e Combinação 6 (pulegona: 8 mg/ml e mentofurano: 8 mg/ml). \*  $P < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho os compostos carvona, mentona, mentofurano e pulegona foram testados de forma isolada em espécies de *Candida* para avaliar a sua atividade antifúngica e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM encontrada após a exposição dessas espécies ao tratamento com os compostos foi de 0,5 a 8 mg/ml. Resultados de trabalhos anteriores (Busato de Feiria et al., 2016) feitos nos laboratórios de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP mostram que as espécies de planta *Mentha arvensis* (que contém entre seus compostos químicos mentona e pulegona) e a espécie *Mentha piperita* (que contém entre seus compostos químicos pulegona) tiveram ação antifúngica sobre células planctônicas das mesmas espécies de *Candida* testadas no presente trabalho. Os dados obtidos por Busato de Feiria et al. (2016) mostraram que o óleo essencial da espécie *Mentha arvensis* inibiu o crescimento de células planctônicas das mesmas espécies testadas no presente trabalho em concentrações de 0,315 a 1 mg/ml e *Mentha piperita* inibiu o crescimento das leveduras nas concentrações de 0,062 a 2 mg/ml. Os resultados do presente estudo somados ao trabalho de Busato de Feiria et al. (2016) sugerem que os compostos de *Mentha* spp. quando em combinação no óleo essencial apresentam ação mais eficaz, inibindo o crescimento das leveduras em concentrações menores comparado aos compostos isolados.

A ação mais efetiva de compostos quando em combinação é denominada sinergismo. O sinergismo é um tipo de ação farmacológica obtida a partir da combinação de dois ou mais compostos, cuja resultante é maior do que a soma dos efeitos isolados de cada um deles (Secoli, 2001). A obtenção do efeito sinérgico pode resultar em vários benefícios, como por exemplo, a diminuição de possíveis efeitos colaterais do tratamento, a diminuição da dose e maior eficácia na ação terapêutica. Em contrapartida, a ação antagonista entre compostos num mesmo fitoterápico pode diminuir sua eficácia, até mesmo inviabilizando o tratamento (Ulrich-Merzenich et al., 2010; Wagner, 2011).

Para verificar se os compostos carvona, mentona, mentofurano e pulegona apresentavam sinergismo quando em combinação, foram feitos testes de microdiluição em caldo pelo método de *Checkerboard*, nos quais foi possível observar a ação antifúngica desses compostos em 6 diferentes combinações e comparar os resultados obtidos nesse ensaio com os resultados dos mesmos compostos testados

de forma isolada. Foi observado que enquanto os compostos isolados apresentaram ação antifúngica nas concentrações de 0,5 a 8 mg/ml, as combinações tiveram redução expressiva nas concentrações que inibiram o crescimento das mesmas cepas. Um exemplo a ser observado é o isolado clínico *Candida albicans* 335. Enquanto o composto isolado mentona inibiu seu crescimento na concentração de 8 mg/ml e o composto isolado pulegona em 1 mg/ml, a combinação desses dois compostos inibiram o crescimento da mesma cepa na concentração de 0,0625 mg/ml de mentona e 0,0004 mg/ml de pulegona. Os dados do presente estudo corroboram com a literatura. Samber et al. (2015) também demonstrou em estudo que óleo essencial de *Mentha piperita* apresentou CIM em concentrações mais baixas comparado ao composto isolado carvona, testados sobre espécies de *Candida*. Esses dados sugerem que os compostos químicos quando em associação com outros compostos presentes no óleo essencial são mais efetivos. Peric et al., (2019) também demonstraram que as ações sinérgicas dos componentes presentes no óleo são responsáveis pela ação antifúngica em menores concentrações comparados aos isolados. Ainda, estudos mostram que a combinação do óleo essencial com medicamentos já utilizados contra *Candida* potencializam a ação dos medicamentos convencionais (Stringaro et al., 2018; Santos et al., 2012). Esses dados indicam caminhos para estudos posteriores que possam avaliar a associação entre compostos isolados, óleo essencial e medicamentos convencionais permitindo assim maior efetividade dos tratamentos.

Em relação ao Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) que classifica a ação dos compostos em “sinergismo, antagonismo e sem interação”, a associação entre os compostos do presente estudo apresentou sinergismo, exceto os isolados clínicos *Candida albicans* 330 e 335 nas combinações 1 (carvona e mentona) e 3 (carvona e pulegona), não demonstrando interação entre os compostos. O mesmo ocorreu com a combinação 1 (carvona e mentona) para as cepas *Candida parapsilosis* CBS 604 e *Candida guilliermondii* CBS 566, não apresentando interação entre os compostos. Para o isolado clínico *Candida albicans* 378 não houve interação dos compostos para as combinações 2 (carvona e mentofurano) e 3 (carvona e pulegona). Embora o ICIF tenha classificado a ação dessas combinações sobre as cepas como “sem interação”, foi possível observar que as concentrações que inibiram o crescimento das cepas reduziram expressivamente quando comparado às

concentrações dos mesmos compostos isolados. Sendo assim, sugere-se que mesmo o ICIF tenha classificado os resultados da combinação de tais compostos como “sem interação”, esses compostos apresentam sinergismo quando combinados.

O método de “*Checkerboard*” com critérios de interpretação pelo ICIF utilizado no presente estudo é o método mais usado para avaliar a relação de “sinergismo, antagonismo ou ausência de interação” entre compostos antimicrobianos (Odds, 2003; Lewis et al., 2002). Porém, alguns autores tem encontrado discordância na classificação desse índice (Lewis et al., 2002; Rand et al., 1993). Em estudo feito com três metodologias *Checkerboard*, *Time-kill* e *Efest*, que determinam a relação entre compostos, foram encontrados diferentes interpretações para um mesmo resultado (Lewis et al., 2002). Ainda, em estudo feito por Henley-Smith et al. (2014) foi utilizado um modelo de análise que não se baseia no ICIF e sim em dados estatísticos. Com esse trabalho, os autores sugerem que os resultados da relação entre os compostos vão além da classificação do ICIF. Sendo assim, os dados do presente estudo corroboram com a literatura (Lewis et al., 2002; Rand et al., 1993, Henley-Smith et al., 2014) com relação a discordância da classificação pelo ICIF, pois mesmo que esse método de classificação não considere alguns resultados como sinergismo, sugere-se a ação sinérgica para os resultados obtidos.

A ação dos compostos nas células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 analisadas em Citômetro de Fluxo mostram que as células apresentaram baixa marcação para o Iodeto de propídeo entre 2,11% e 11,47%, sendo que para os compostos mentona e mentofurano nas concentrações sub-biofilme as células não apresentaram marcação após o tratamento. A baixa marcação ou ausência da mesma sugerem que os compostos não atuam na parede celular de *Candida albicans* ATCC MYA-2876. Já para o DIOC<sub>6</sub>, as células apresentaram marcação entre 97,71 e 99,03% indicando ação dos compostos isolados de *Mentha* spp. sobre a membrana citoplasmática de *Candida albicans* ATCC MYA-2876. Para o marcador DHR 1,2,3 que permite monitorar a formação de espécies reativas de oxigênio, as células apresentaram marcação entre 7,5 e 43,8% indicando formação de reativos de oxigênio dose- dependente.

Para complementar as análises em Citômetro de Fluxo de células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com os compostos, as células foram visualizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão para observar a ação

dos compostos na morfologia celular. Nas células sem o tratamento observou-se preservação da integridade celular com paredes e membrana citoplasmática bem delimitadas. Já as células tratadas com os compostos isolados ou em associação apresentaram alterações celulares como retração do conteúdo citoplasmático, formação de vacúolos citoplasmáticos, irregularidades na membrana citoplasmática como ondulações e rugosidades. Os dados obtidos nos ensaios com as células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 tratadas com os compostos, analisadas em Citômetro de Fluxo e em Microscópio Eletrônico de Transmissão corroboram com a literatura, que aponta que óleos essenciais e seus compostos atuam na membrana citoplasmática. Tais estudos sugerem que compostos presentes em óleos essenciais podem atuar na permeabilidade e despolarização da membrana citoplasmática (Peric et al., 2019; Peixoto et al., 2017; Viuda-Martos et al., 2008; Pierce et al., 2017).

Palmeira-de-Oliveira et al. (2009) observou que óleos essenciais também podem atuar rompendo a membrana citoplasmática. Cristani et al. (2007), Perlin, (2011), Pierce et al. (2017), relataram que a atividade antimicrobiana de compostos vegetais está relacionada à capacidade dos terpenos de afetar a permeabilidade da membrana citoplasmática. Isso permite que os compostos possam atravessar a membrana e interagir com outras estruturas da célula (Viuda-Martos et al., 2008). Também, a ação sobre a permeabilidade iônica pode resultar em alterações do fluxo de prótons e alterações de pH intracelular (Omidbeygi et al., 2007).

O óleo essencial de *Mentha piperita* e dos compostos carvona e mentona foram relatados por atuar sobre a bomba de prótons  $H^+$  ATPase, uma proteína de membrana relacionada ao transporte ativo de prótons através da membrana da célula. Na membrana citoplasmática,  $H^+$  ATPase regula o pH intracelular (Samber et al., 2015; Stewart et al., 1988). O efluxo de  $H^+$  mediado por  $H^+$ ATPase da membrana plasmática em *Candida albicans* foi determinado na presença de óleo essencial de *Mentha piperita* e dos compostos carvona e mentona. Tais compostos naturais inibiram o efluxo de  $H^+$  comparados ao controle, sem o tratamento. Esse efeito, pode alterar o pH intracelular, afetando a fisiologia da célula, como o estudo feito por Stewart et al. (1988) o qual demonstra que a alcalinização citoplasmática pode afetar a formação de tubos germinativos em *Candida albicans*. Ainda, tais compostos atuam inibindo a biossíntese de ergosterol, principal esteroide das membranas celulares fúngicas, que atua na integridade das células.

A formação de vacúolos citoplasmáticos após tratamento com compostos vegetais também foram descritos na literatura. Estudo feito por Rajkowska et al. (2019) com compostos terpenóides em *Candida albicans*, detectou a presença de vacúolos no citoplasma com conteúdo do óleo essencial, o que sugere que tais estruturas atuam como mecanismos de defesa de *Candida* para uma “desintoxicação” celular. Ramsai e Gadd (1997) mostraram que *Saccharomyces cerevisiae* mutantes, deficientes na produção de vacúolos, acumularam metais tóxicos dentro das células. Oliva et al., (2011) também observou a presença de grandes vacúolos no citoplasma após o tratamento com óleo essencial contendo terpenóides em espécies de *Candida*.

Os resultados do presente estudo mostram que os compostos carvona, mentona, mentofurano e pulegona aumentam a formação de espécies reativas de oxigênio nas células de *Candida albicans* ATCC MYA 2876 dose-dependente. Tal efeito também foi observado em estudo feito por Ferreira et al. (2014) após o tratamento de leveduras com o óleo essencial de *Mentha piperita*.

Nos ensaios de formação de biofilme uniespécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 foi observado que após os tratamentos com os compostos isolados, apenas carvona e pulegona impediram a progressão do biofilme em 63 e 83% respectivamente. Os compostos isolados mentona, mentofurano e as combinações não impediram a progressão do biofilme. No biofilme maduro os compostos isolados e em combinações não desconstruíram essa estrutura em 50% ou mais.

A literatura mostra que os biofilmes duo-espécie de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* exibem maior biomassa e são mutuamente benéficos comparados ao biofilme uniespécie (Lobo et al., 2019; Chevalier et al., 2018). Ainda, Falsetta et al.(2014) mostram que a presença de *Candida albicans* em biofilme de *Streptococcus mutans* aumenta a produção de exopolissacarídeos tornando o biofilme mais espesso e também induz a expressão de genes de virulência por *Streptococcus mutans*.

No biofilme duo-espécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610 apenas carvona e pulegona impediram a formação da biomassa em 79 e 86% respectivamente. Os demais compostos ou combinações não impediram a progressão do biofilme em 50% ou mais. Embora a maioria dos compostos não tenham demonstrado ação expressiva impedindo a

progressão do biofilme em formação ou desconstruindo o biofilme maduro em 50% ou mais, estudos anteriores do biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 tratados com os compostos isolados mostraram redução de até 99% da viabilidade celular do biofilme em formação e até 97% do biofilme maduro (Boni et al., 2016). Busato de Feiria et al. (2016) também observou inibição da atividade metabólica do biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 após tratamento com óleo essencial das espécies *Mentha aquática*, *Mentha arvensis* e *Mentha piperita*. Benzaid et al. (2019) também observou que o óleo essencial de *Mentha piperita* diminuiu aproximadamente 70% a atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans*. Sendo assim, os resultados obtidos nos ensaios de biofilme do presente trabalho, somados aos estudos anteriores feitos em nosso laboratório e dados da literatura sugerem que embora os compostos presentes no óleo essencial de espécies de *Mentha* não apresentem ação na biomassa do biofilme, tais compostos atuam na viabilidade das células presentes no biofilme. Ainda, em relação ao biofilme duo-espécie, a presença de *Streptococcus mutans* no biofilme com *Candida albicans* pode ter tornado o biofilme mais robusto e resistente à ação dos compostos. Sendo assim, abrem-se caminhos para futuros estudos mais aprofundados sobre os mecanismos pelos quais esses compostos possam atuar sobre o biofilme.

## 7 CONCLUSÃO

- Carvona, mentona, mentofurano e pulegona isolados e em associação possuem ação antifúngica contra células planctônicas de *Candida* spp., sendo que em combinação, os compostos são mais efetivos;

- A classificação pelo ICIF mostra que a maior parte das combinações apresentou sinergismo. As combinações 1 e 3 sobre a cepa clínica *C. albicans* 335 e *C. albicans* 330; a combinação 1 sobre a cepa *C. parapsilosis* 604 e *C. guilliermondii* 566; as combinações 2 e 3 sobre a cepa *C. albicans* 378 não apresentam interação entre os compostos. Não há antagonismo entre os compostos testados;

- Os compostos isolados atuam na membrana citoplasmática de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e induzem a formação de espécies reativas de oxigênio na célula dose-dependente;

- Os compostos isolados e em associação promovem retração do conteúdo citoplasmático, irregularidades na membrana citoplasmática e aumento na formação de vacúolos citoplasmáticos nas células de *Candida albicans* ATCC MYA-2876;

- Carvona e pulegona isolados impedem a progressão do biofilme em formação de *Candida albicans* ATCC MYA-2876.

Mentona, mentofurano e os compostos em associação não impedem a progressão da biomassa do biofilme nos valores esperados. Os compostos isolados e em associação não desconstroem a biomassa do biofilme maduro dessa espécie nos valores esperados;

- Carvona e pulegona isolados impedem a progressão do biofilme duo-espécie de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 e *Streptococcus mutans* ATCC 700610.

Mentona, mentofurano e os compostos em associação não impedem a progressão da biomassa do biofilme nos valores esperados.

## REFERÊNCIAS

- Abolfazl M, Hadi A, Frhad M, Hossein N. In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2014; 8(3): 186-194.
- Abdelli M, Moghrani H, Aboun A, Maachi R. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Ind. Crops Prod*. 2016; 94, 197–205.
- Aggarwal KK, Khanuja SPS, Ahmad A, Santha Kumar TR, Gupta VK, Kumar S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour Fragr J*. 2002; 17(1):59–63.
- Arendrup MC, Patterson PF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment *J. Infect. Dis*. 2017.
- Arruda AT, Rossana MP, Antunes RMP, Catão RMR, Lima EO, Sousa DP et al. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 16(3): 307-311.
- Battistin A, Fermino MH, Silveira JRP, Gonçalves RS, Pasquetti MV, Santos AE, et al. Espécies de *Mentha* com propriedades medicinais, aromáticas e condimentares. Circular técnica. Porto Alegre: FEPAGRE; 2011.
- Ben-Ami R. Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review. *J. Fungi*. 2018, v.4, p. 2-18.
- Benzaid C, Belmadani A, Djeribi R, Rouabhia M. The Effects of *Mentha \_ piperita* Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes. *Antibiotics*. 2019.

Boni GC, Busato de Feiria SN, Santana PL, Anibal PC, Boriollo MFG, Buso-Ramos MM, Barbosa JP, Oliveira TRO, Höfling JF. Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. *African Journal*. 2016; 10, p. 203-210.

Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC: Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012; 4.

Busato de Feiria SN, Santana PL, Boni GC, Anibal PC, Boriollo MFG, Figueira GM, Sousa IMO, Pereira B, Foglio MA, Höfling JF. Essential oil composition of *Mentha* spp. extracted seasonally and their effects against *Candida* yeast growth and biofilm formation. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 2016; 4(4), 106-115.

Busscher HJ, Van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv. Dent. Res*. 1997, 11, 24–32.

Chevalier M, Ranque S, Precheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a Review. *Medical Mycology*. 2018.

Chowdhary, A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017: 13.

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

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003, 36(5): 599-607.

Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol. Lett*. 2014; 162, 22–38.

- Cristani M, d'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007.
- Dalle F, Wachtler B, Coralie L, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* 2009.
- Delgado-Silva Y, Vaz C, Carvalho-Pereira J, Carneiro C, Nogueira E, Correia A, et al. Participation of *Candida albicans* transcription factor RLM1 in cell wall biogenesis and virulence. *PLoS ONE* 2014; 9.
- Donlan RM: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:881-890.
- Dukic NM, Bozin B, Soković M, Matavuklj M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Med.* 2003; 69(5):413– 9.
- Ertas A, Gören AC, Há simi N, Tolan V, Kola U. Evaluation of Antioxidant, Cholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Properties of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* and Its Secondary Metabolites. *Rec. Nat.Prod.* 2015; 9, 105–115.
- Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Chia-Hua Pai et al. Symbiotic Relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Synergizes Virulence of Plaque Biofilms In Vivo. *Infection and Immunity.* 2014; p. 1968–1981.
- Fan D, Coughlin LA, Neubauer MM, Kim J, Kim MS, Zhan X. et al. Activation of HIF-1alpha and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. *Nat. Med.* 2015; 21, 808–814.
- Fazly A, Jain C, Dehner AC, Issi L, Lilly EA, Ali A, Cao H, Fidel PL Jr, Rao RP, Kaufman PD: Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sc.* 2013, 110:13594-13599.

Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32(3):329-38.

Ferreira P, Cardoso T, Ferreira F, Fernandes-Ferreira M, Piper P, Sousa MJ. *Mentha piperita* essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. *FEMS Yeast Research*. 2014; v.14, p. 1006–1014.

Freire JCP, Júnior JKO, Silva DF, de Sousa JP, Guerra FQS, de Oliveira Lima E. Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2017.

Freitas C, Neves E, Reis A, Passarinho PC, da Silva TL. Use of multi-parameter flow cytometry as tool to monitor the impact of formic acid on *Saccharomyces carlsbergensis* batch ethanol fermentations. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169(7):2038–48.

Garbee DD, Pierce SS, Manning J. Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Crit Care Nurs Clin N Am*. 2017; 67–79.

Hwang G, Marsh G, Gao L, Waugh R, Koo H. Binding force dynamics of *Streptococcus mutans*-glucosyltransferase B to *Candida albicans*. *J. Dent. Res*. 2015; 94, 1310–1317.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol*. 2011; 10, 112–122.

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

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

Henley-Smith CJ, Steffens FE, Botha FS, Lall N. Predicting the influence of multiple components on microbial inhibition using a logistic response model - a novel approach. *BMC*. 2014.

Hitchcock CA, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ. Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P-450-dependent 14 alpha-sterol demethylase purified from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 1990; 266:475–480.

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

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

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

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

Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology.* 2016; p. 487-494.

Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373, 1445–1456.

Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2002.

Lionakis MS, Netea MG, Holland SM. Mendelian genetics of human susceptibility to fungal infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014; 4.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* (1997). 90, 939–949.

Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, Leite LDS, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species Biofilms. *Journal of Oral Microbiology*. 2019.

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64, 134–140.

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

Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *J Food Sci.* 2009; 74(7):358–63.

McCarty TP, Pappas PG. Invasive candidiasis. *J. Infect. Dis. Clin. North Am.* 2016; 30, 103–124.

Mc Cullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis.* 1999; 1220-1225.

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

- Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR: The extracellular matrix of fungal biofilms. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 931:21-35.
- Moghtader M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Menha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *Afr J Plant Sci.* 2013; 7(11):521-527
- Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot JL. *Candida* Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *Journal off fungi.* 2018.
- Murad AM, Leng P, Straffon M, Wishart J, Macaskill S, MacCallum D et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.*2001; 20, 4742–4752.
- Nami S, Aghebati-Maleki A, Morovati H, Aghebati-Maleki L. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019; 110, p. 857-868.
- Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2015; 15, 630–642.
- Nguyen MH, Yu VL. Meningitis caused by *Candida* species: An emerging problem in neurosurgical patients. *Clin. Infect. Dis.* 1995;21:323–327.
- Odds FC. Synergy, antagonism and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52:1.
- Oliva Mde L, Carezzano ME, Gallucci MN, Demo MS. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Nat Prod Commun.*2011; 6(7),1039-43.
- Omidbeygi M; Barzegar M; Hamidi Z; Nafhdibadi H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control.* 2007;18: 12, 1518-1523.

Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, Pina-Vaz C, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-Candida activity of essential oils. *Mini Rev Med Chem*. 2009; 9:1292–305.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive Candidiasis. *Nature Reviews*. 2018.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin. Infect. Dis*. 2003; 37, 634–643.

Perić M, Rajković K, Lemić AM, Živković R, Arsenijević VA. Development and validation of mathematical models for testing antifungal activity of different essential oils against *Candida* species. *Archives of Oral Biology*. 2019. 98: 258–264.

Perlin DS. Current perspectives on echinocandin class drugs *Future Microbiology*, (2011), 6, 441-457.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1):133–163.

Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3807–3810.

Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. 2007; 5:64.

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, Edwards JE, Jr., Filler SG. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol.* 2005; 7:499–510.

Peixoto LR; Rosalen PL; Ferreira GLS; Freires IA; Carvalho FG, Castellano LR; Castro RD. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2017; 73:179-185.

Pierce CG, Vila T, Romo JA, Montelongo-Jauregui D, Wall G, Ramasubramanian A, Lopez-Ribot JL: The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. *J Fungi.* 2017; 3.

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

Powers CN, Osier JL, McFeeters RL, Brazell CB, Olsen EL, Moriarity DM et al. Antifungal and cytotoxic activities of sixty commercially-available essential oils. *Molecules.* 2018. 23, 1549.

Puel A, Cypowyj S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 12, 616–622.

Rajkowska K, Nowicka-Krawczyk P, Kunicka-Styczynska A. Effect of Clove and Thyme Essential Oils on *Candida* Biofilm Formation and the Oil Distribution in Yeast Cells. *Molecules.* 2019.

Rajkowska K, Otlewska A, Kunicka-Styczynska A, Krajewska A. *Candida albicans* Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory Concentrations. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18, 1307.

Rand KH, Houck HJ, Brown P, Bennett D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1993.

Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL: Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6:979-986.

Ramsay LM, Gadd GM. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;152, 293–298.

Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis*. 2000; pp. 85-91.

Rodrigues ME, Henriques M, Silva S. Disinfectants to Fight Oral Candida Biofilms. *Adv Exp Med Biol*. 2016.

Roque FP, Anibal PC, Busato SN, Boni GC, Hoffling JF, Queiroz NCA et al. In vitro anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. In vitro anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 2015; 3: 55-61.

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

Samber N, Khan A, Varma A, Manzoor N. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharm Biol* 2015.

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

Santos KKA, Matias EF, Souza CE, Tintino SR, Braga MF, Guedes GM et al. Anti-Candida activity of *Mentha arvensis* and *Turnera ulmifolia*. *Journal of Medicinal Food*. 2012; 15, n. 3, p. 322–324.

Scazzocchio F, Garzoli S, Conti C, Leone C, Renaioli C, Pepi F, Angiolella L. Properties and limits of some essential oils: chemical characterization, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. *Nat. Prod. Res.* 2016; 30, 1909–1918.

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

Secoli SR. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. *Rev Esc Enf USP*. 2001; v.35, n. 1, p. 28-34.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012.

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

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014.

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

Spagnoletti A, Guerrini A, Tacchini M, Vinciguerra V, Leone C, Maresca I et al. Chemical Composition and Bio-efficacy of Essential Oils from Italian Aromatic Plants: *M. suaveolens*, *C. capitatus*, *O. hirtum* and *R. officinalis*. *Nat. Prod. Commun*. 2016;11, 1517–1520.

Steinbach WJ, Perfect JR, Cabell CH, Fowler VG, Corey GR, Li JS, Zaas AK, Benjamin DK Jr. A meta-analysis of medical versus surgical therapy for *Candida* endocarditis. *J. Infect.* 2005; 51:230–247.

Stewart E, Gow NA, Bowen DV. Cytoplasmic alkalization during germ tube formation in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 1988; 134(5):1079-87.

Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gpbB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology.* 2008; 23: 466–473.

Stringaro A, Colone M, Angiolella L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha* spp. *Essential Oils. Medicines.* 2018; 5, p. 2-15.

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

Ulrich-Merzenich G, Panek D, Zeiter H, Vetter H, Wagner H. *Crug*. Development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian Journal of Experimental Biology.* 2010; 48, p.208-219.

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

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

Viuda-Martos M, Ruiz-Navjas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety.* 2008.

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with Epithelial Cells. *Cell Microbiol.* 2010.

Wagner H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia.* 2011; 82, p.34-37.

Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio BV, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology.* 2019; 52:1–6.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MAO. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology.* 2011.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39, 309–176.

## ANEXO 1: Verificação de originalidade e prevenção de plágio

## EFEITO DE BIOCOMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE MENTHA SPP. SOBRE ESPÉCIES DE CANDIDA. AÇÃO ANTIFÚNGICA”

### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



### FONTES PRIMÁRIAS



Excluir citações

Em

Excluir correspondências < 1%

Excluir bibliografia

Desligado