



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



IZA TEIXEIRA ALVES PEIXOTO
Cirurgiã-dentista

**"Atividade antimicrobiana do óleo essencial
de diferentes acessos de *Mentha* spp. contra
Candida albicans e *Candida dubliniensis*"**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de
Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Co-orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Marta Cristina Teixeira Duarte

Piracicaba
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

P359a	<p>Peixoto, Iza Teixeira Alves. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes acessos de <i>Mentha</i> spp. em <i>Candida albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i> / Iza Teixeira Alves Peixoto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: José Francisco Höfling, Marta Cristina Teixeira Duarte. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Plantas medicinais. 2. <i>Mentha</i> spp. 3. <i>Candida</i> spp. 4. Biofilm 5. Citotoxicidade. I. Höfling, José Francisco. II. Duarte, Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(eras/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Antimicrobial activity of essential oils of different accesses of *Mentha* spp. against *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Medicinal plants. 2. *Mentha* spp. 3. *Candida* spp. 4. Biofilm 5. Citotoxicity

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: José Francisco Höfling, Antonio Olavo Cardoso Jorge, Thaís Helena Gasparoto, Mary Ann Foglio, Renata de Oliveira Mattos-Graner

Data da Defesa: 10-12-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



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 10 de Dezembro de 2010, considerou a candidata IZA TEIXEIRA ALVES PEIXOTO aprovada.

Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

Profa. Dra. THAIS HELENA GASPAROTO

Prof. Dr. ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE

Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

*Aos meus pais Sônia e Anibal,
meus grandes exemplos de pessoas do bem,
fontes de inspiração para todo o meu aprendizado.
Minhas vitórias serão sempre dedicadas a vocês!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por iluminar meus caminhos e decisões.

À minha grande família:

Aos meus pais **Sônia e Aníbal**, meus irmãos **Gustavo e Aníbal**, à querida **Mila** e a linda sobrinha **Lara**.

Por terem acreditado em mim e me ensinado a sonhar com humildade e sensibilidade.

Por entenderem minha ausência, pelo respeito aos meus ideais.

Ao meu orientador:

Prof. Dr. José Francisco Hofling

Pela confiança e auxílio na elaboração desse trabalho, pelos ensinamentos de vida e orientação docente, que contribuiu muito na minha formação profissional.

À minha Co-orientadora:

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

A sua orientação científica e amabilidade, que me incentivaram na busca incessante de conhecimento a dedicar o meu melhor nesse trabalho.

Aos professores mexicanos:

Profa. Dra. Azucena Cárdenas Oranday, Profa. Dra. Catalina Rivas, Profa. Dra. Myrian Angélica de La Garza, Profa. Dra. Alberto Gómez Treviño

Reciban mi reconocimiento por todo lo que aprendí. Aquí estaré para retribuirles todo su cariño cuando vengan a Brasil.

Ao **Prof. Dr. José Luiz López-Ribot**

Reciba mi reconocimiento por su conocimiento y por todo el bien que hace, por su simplicidad y la sabiduría de un grande maestro.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e Universidade Estadual de Campinas, pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação.

Aos Profs. Drs. Renata de Oliveira Mattos- Graner e Daniel Saito pelo incentivo e apoio, sempre que necessitei.

Agradeço também, de modo especial, aos Profs do CPQBA pela generosidade, disponibilidade e pelo valioso auxílio. Nos procedimentos de agrícolas, à Dra. Glyn Mara Figueira e Dr. Benício Pereira; nos procedimentos cromatográficos, ao Dr. Adilson Sartorato e nos procedimentos de cultivo celular, à Dra. Ana Lúcia Tasca Ruiz e ao Dr. João Ernesto Carvalho.

À FAPESP – Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Antonio Olavo Cardoso Jorge, Thaís Helena Gasparoto, Mary Ann Foglio e Renata de Oliveira Mattos-Graner, por aceitarem compor a banca examinadora desta tese.

À Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, Coordenadora do curso de Pós-graduação em Biologia Buco-dental da FOP-Unicamp.

Aos colegas, Regianne Umeko Kamiya, Vívian Fernandes Furletti, Sérgio Braga Cruz, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Paula Cristina Aníbal, Rafael Nóbrega Stipp, Ítalo Sarto Carvalho Rodrigues, Cristiane Duque, Érika Harth Nickitsa, Juliana Joana de Moraes Carvalho, Andressa Monteiro Venturine, Fernando Zammumer, Tiago Taiete e Thaís Rossini de Oliveira. Obrigada por compartilhar o tempo, o conhecimento, alegrias e tristezas... com vocês minha travessia ficou mais bonita!

Às queridas Wilma Ferraz e Renata Preté pelo apoio e pelos bons e inesquecíveis momentos de convivência e amizade.

Aos funcionários e amigos do CPQBA Luana Rabonatto, Aline Rabonatto, Camila Delarmelina, Éricka Letícia da Silva, Márcio de Oliveira e Renata Teixeira.

As minhas amigas-irmãs, Carol, Pola e Leila que me proporcionaram convívio muito agradável, demonstrando nobres valores de amizade, cumplicidade e companheirismo.

À amiga Luciana Salles Branco de Almeida pela amizade, por ser uma pessoa do bem.

Aos meus amigos mexicanos Cláudia Murga, Julian Zaragosa, Jezabel Barrera, Natalie e Izaac, David Gómez, Maestra Graziela, Angélica Serena e Profa. Aída Garcia Rodriguez, pela grande parceria profissional. Obrigada pelo carinho e paciência que sempre tiveram comigo!

Aos amigos que fiz nos EUA, Anna Lazel, Sarah e Larah, Christopher Pierce, Prya e Ashock, Natalia e Angel. Obrigada pelo carinho e paciência que sempre tiveram comigo!

Aos amigos da FOP que compartilhei minha vida!

A todos os meus amigos e familiares baianos, inclusive Fabiana Praia Rodrigues e Ediane Lustosa Pedreira e Lorena Lima pela torcida pelo meu sucesso. Que me incentivaram nos meus sonhos e entenderam a minha ausência.

À vovó Rachel Barreto de Araújo Peixoto (*in memoriam*), que receba mais uma violeta em sua janela.

À Piracicaba, esta bela e acolhedora cidade, que terá sempre o meu respeito.

*Sem sonhos as perdas se tornam insuportáveis,
As pedras do caminho se tornam montanhas,
Os fracassos se transformam em golpes fatais.*

Mas, se você tiver grandes sonhos...

Seus erros produzirão crescimento,

Seus desafios produzirão oportunidades,

Seus medos produzirão coragem.

Por isso, você é do tamanho dos seus sonhos.

Augusto Cury

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de óleos essenciais e frações de diferentes acessos de *Mentha* spp. contra *Candida* spp., identificando seus compostos e verificando sua citotoxicidade. Os 64 óleos essenciais de diferentes acessos de *Mentha* spp. foram extraídos utilizando as partes aéreas da planta fresca, por hidrodestilação em sistema tipo Clevenger. Os óleos foram testados contra isolados clínicos e de referência de *Candida albicans* (CBS 562) e *Candida dubliniensis* (CBS 7987). A CIM foi determinada por meio do método de microdiluição (CLSI, 2002). Os melhores acessos testados em células planctônicas foram fracionados em 5 partes em cromatografia de coluna seca e testados posteriormente contra biofilme de *C. albicans* (SC 5314). Com o inóculo padronizado em meio RPMI-1640, os biofilmes foram produzidos em placas esterilizadas de polietileno de 96 poços, para testes dos óleos e frações em biofilme maduro e biofilme em formação, sendo quantificados com solução de XTT e analisados através de microscopia óptica e confocal a laser. Os compostos dos melhores óleos e frações foram identificados por cromatografia em camada delgada e cromatografia a gás com detector de massas. A citotoxicidade também foi provada em painel de diferentes linhagens celulares células epiteliais, por meio da avaliação da atividade antiproliferativa, *in vitro*, utilizando-se o ensaio de sulforrodamina B para avaliação do crescimento celular. O melhor rendimento em óleo essencial (base seca) foi observado para o acesso de *M. rotundifolia* CM 31 (1,5 %). Quatro óleos se destacaram, apresentando forte atividade com amplo espectro, sendo *M. canadensis* (CM 05) - (<0,007 a 0,500 mg/mL); *M. spicata* (CM 30) (0,062 mg/mL a 0,500 mg/mL); *M. arvensis* CM 36 (<0,007 mg/mL a 1 mg/mL) e *M. suaveolens x spicata* (CM 52) - (0,062 mg/mL a 0,500 mg/mL). As frações F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52 demonstraram a melhor atividade dentre os óleos e frações testadas, apresentando 49 % e 38 % de inibição na concentração de 0,5 mg/mL para biofilme maduro e 70 % de inibição (a 0,062 mg/mL) e 61 % de inibição (a 0,125 mg/mL), respectivamente, para inibição de biofilme em formação. Esses resultados foram confirmados pelas análises microscópicas. Os compostos majoritários do óleo de *M. canadensis* CM 05 foram carvona (74,84 %) e linalol (4,84 %); de *M. spicata* CM 30 óxido de piperitenona (28,05 %), beta-E-farneseno (18,58 %) e gama-muuroleno (17,38 %); *M. arvensis* CM 36 Linalol (33,24 %), acetato de linalol (21,97 %) e alfa-terpineol (11,77 %); de *M. suaveolens x spicata* CM 52 pulegona (52,20 %), piperitenona (29,51 %) e gama-muuroleno (4,44 %). Os óleos essenciais de *Mentha* spp. apresentam atividade antimicrobiana contra células planctônicas de *Candida* spp. (de moderada a fraca), exceto os óleos originados dos acessos de *M. canadensis* CM 05, *M. spicata* CM 30, *M. arvensis* CM 36 e *M. suaveolens x spicata* CM 52. As frações F2 e F3 de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 demonstram efeito antimicrobiano inibitório sobre biofilme em formação e sobre biofilme maduro, além de ausência de citotoxicidade para células testadas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Mentha* spp., *Candida* spp., biofilme, citotoxicidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils and fractions of different accessions of *Mentha* spp. against *Candida* spp., identifying compounds and verifying its cytotoxicity. The essential oils of 64 different accessions of *Mentha* spp. were extracted using the fresh aerial parts of the plant by hydrodistillation cleavenger type system. Then, the oils were tested against clinical isolates and reference strains *Candida albicans* (CBS 562) and *Candida dubliniensis* (CBS 7987). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution method, using the CLSI protocol. The best accessions tested on planktonic cells were separated into 5 parts by dry column, and oils and fractions were subsequently tested against biofilms of *C. albicans* (SC 5314). With standardized inoculum in RPMI-1640, the biofilms were produced in sterile polyethylene plates with 96 wells, for to evaluate the oils and fractions in preformed biofilm and inhibition biofilm formation. After the biofilm was quantified with XTT solution and analyzed by optical and confocal microscopy. The compounds were further identified by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The cytotoxicity was also tested in epithelial cells as well as antitumor activity, by evaluating the antiproliferative activity in different cell lines using the test sulforodamina B (SBR) for evaluation of cell growth. The best yield in essential oil (dry basis) was observed for the accessions *M. rotundifolia* CM 31 (1.5% dry basis). Among the 64 oils, four stood out, showed strong activity with broad spectrum, inhibiting all strains tested, and these, *M. canadensis* (CM 05) - (<0.007 to 0.187 mg/mL to 0.500 mg/mL), *M. spicata* (CM 30) - (0.062 mg/mL to 0.500 mg/mL), *M. arvensis* CM 36 (<0.007 mg/mL to 1 mg/mL) and *M. spicata x suaveolens* (CM 52) - (0.062 mg/mL to 0.500 mg/mL). Fractions F2, F3 *M. spicata x suaveolens* CM 52 showed the best activity among the tested oils and fractions, showing 49% and 38% inhibition at 0.5 mg/mL for preformed biofilm and 70% inhibition (at 0.062 mg/mL) and 61% inhibition (at 0.125 mg/mL), respectively, for inhibitory biofilm formation. These results were confirmed by microscopic analysis. The mainly oil *M. canadensis* 05 CM were carvone (74.84%), linalool (4.84 %); *M. spicata* CM piperitenone oxide were 30 (28.05%), beta-E-farnesene (18.58%) and gamma-muuroloeno (17.38%); *M. arvensis* CM 36 were Linalool (33.24%), acetate, linalool (21.97%) and alpha-terpineol (11.77%); *M. spicata x suaveolens* CM 52 were pulegone (52.20 %), piperitenone (29.51 %) and gamma-muuroloene (4.44 %). Fractions F2 and F3 showed antiproliferative activity for most strains, showing lack of cytotoxicity in epithelial cells tested. The essential oils of *Mentha* spp. exhibit antimicrobial activity against planktonic cells of *Candida* spp. (moderate to weak), except oils originating from accessions of *M. canadensis* CM 05, *M. spicata* CM 30, *M. arvensis* CM 36 and *M. suaveolens x spicata* CM 52. The fractions F2 and F3 of *Mentha spicata x suaveolens* CM 52 shows antimicrobial effect on preformed biofilm and inhibition biofilm, and absence of cytotoxicity to mammalian cells.

Key-words: Medicinal plants, *Mentha* spp., *Candida* spp., biofilm, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
BHI	Brain Heart Infusion
CBS	Centraal Bureau voor Schimmelcultures
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia a gás com detector/espectrometria de massas
CH₂Cl₂	Diclorometano
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratorial Standart Investigation
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DFT	Divisão de Farmacologia e Toxicologia
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GI₅₀	Growth inhibition
H₂O	Água
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HT-29	Linhagem celular de adenocarcinoma colônico humano
K-562	Linhagem celular de leucemia mielóide crônica
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
NCI	National Cancer Institute
NCI-ADR/RES	Linhagem celular de adenocarcinoma de ovário
NCI-H460	Linhagem celular de carcinoma de pulmão
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata
PBS	Solução tampão de salina fosfatada
RPMI-1640	Meio de cultura para leveduras em testes antimicrobianos
SAP	Secreted Aspartyl Proteinase
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
UACC-62	Linhagem celular de melanoma de pele
VERO	Linhagem celular de epitélio normal de rim

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99

1 Introdução

O emprego das plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas de tratamento local, até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial utilizada pelo homem moderno. As novas tendências globais de uma preocupação com a biodiversidade e as idéias de desenvolvimento sustentável, tem despertado interesse no estudo de plantas medicinais brasileiras. O estabelecimento de novas drogas vegetais através da pesquisa nessa área pode conduzir ao correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados à fitoterapia (Lorenzi & Matos, 2002).

Produtos naturais utilizados como fitoterápicos como a hortelã (gênero *Mentha* e família *Lamiaceae*), que produz um dos mais consumidos óleos essenciais, podem originar novas modalidades de tratamento, auxiliando na recuperação e manutenção da saúde. Várias espécies da *Mentha* spp. têm sido alvo de estudos quanto a suas diferenças metabólicas, composições químicas, propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (Oumzil *et al.*, 2002; McKay & Bumber, 2006). Assim, pesquisas estão sendo realizadas para avaliação biológica de suas propriedades medicinais, a fim de que possam combater doenças que acometem o ser humano, em particular, doenças de natureza infecciosa causadas por leveduras do gênero *Candida*.

A candidose se encontra associada ao biofilme dental, válvulas cardíacas, cateteres e tem como etiologia *Candida* spp. associada ao comprometimento do sistema imune do hospedeiro. *C. albicans* é um fungo patogênico oportunista e o mais frequente agente etiológico da candidose, uma infecção com crescente ameaça para a saúde de indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados (Bagg & Silverwood, 1986; Ramage *et al.*, 2005; Uppuluri *et al.*, 2009).

Dispositivos implantados como cateteres, válvulas protéticas do coração, assim como dispositivos relacionados, permitem a este patógeno aderir-se à superfície e formar biofilme, aumentando os índices de infecção fúngica hospitalares (Costerton *et al.*, 1984; Dougherty, 1988; Uppuluri *et al.*, 2009). O biofilme formado por *C. albicans* representa um problema crescente de saúde pública (Ramage *et al.*, 2009; Uppuluri *et al.*, 2009).

Em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas e representa um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (Uppuluri *et al.*, 2010). Assim, o reconhecimento da importância do papel da formação do biofilme nas infecções pelos pesquisadores e pela comunidade médica tem levado a avanços na sua prevenção, diagnóstico e tratamento (Uppuluri *et al.*, 2009).

Infecções por *Candida* spp. envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas oportunistas, tornando o paciente exposto a uma grande diversidade de fatores de risco. No entanto, a literatura evidencia o aumento da resistência de *Candida* spp. aos agentes antifúngicos (Ramage *et al.*, 2005; Mahboubi & Haghi, 2008). Assim, a falta de drogas eficazes para o tratamento de infecções por *Candida* spp., justifica a necessidade de se identificar novos agentes antimicrobianos para o tratamento de enfermidades de origem fúngica originadas de plantas medicinais, como potenciais fitoterápicos.

A ação de determinadas espécies de *Mentha* spp. sobre leveduras de *C. albicans* e outros microrganismos já foi avaliada (Oumzil *et al.*, 2002; Sartoratto *et al.*, 2004; Tampieri *et al.*, 2005). Entretanto, pouco se conhece sobre a influência da composição de óleos essenciais originados de diferentes acessos de *Mentha* spp. no metabolismo da cultura microbiana de *Candida* spp., além de sua citotoxicidade.

Deste modo, vale ressaltar a importância do estudo dos óleos essenciais de *Mentha* spp. de forma que, não só as indústrias de fitofármacos, mas também a cosmética, alimentícia, química e de higiene pessoal possam selecionar o acesso de *Mentha* spp. não apenas com a função de melhorar o odor ou sabor do produto, mas também para aplicações antimicrobianas terapêuticas. Ainda, as indústrias podem escolher o acesso mais adequado a sua produção, ou seja, aquele que produz o óleo de melhor rendimento, melhor atividade antimicrobiana, numa baixa concentração e que não seja citotóxica aos tecidos humanos.

A literatura mostra que esse óleo possui diversas propriedades para ser considerado um potencial fitoterápico, para controle dos níveis de infecções causadas por *C. albicans* em pacientes hospitalizados e imunodeprimidos, que é de fundamental relevância.

Nosso objetivo, portanto, foi verificar a ação antimicrobiana de diferentes acessos ou genótipos de óleos essenciais de *Mentha* spp., bem como citotoxicidade para formar subsídios básicos para prática clínica.

2 Revisão de Literatura

2.1 Espécies do gênero *Candida*

Espécies de *Candida* são organismos eucariotos, não fotossintéticos, possuindo organelas citoplasmáticas, parede celular, e uma membrana plasmática rica em esteróis, usualmente o ergosterol (Akpan & Morgan, 2002). Esse gênero compreende mais de 150 espécies, que crescem bem em temperaturas variando entre 20°C a 38°C, e numa faixa de pH de 2,5 a 7,5 (Odds, 1993).

Candida spp. são leveduras comensais que fazem parte da microbiota residente de indivíduos sadios. Esses microrganismos permanecem em homeostase, como reflexo de um equilíbrio altamente dinâmico entre a microbiota e o hospedeiro. Entretanto, quando há uma ruptura na homeostase ou algum comprometimento do sistema imune do hospedeiro, as espécies do gênero *Candida* podem se tornar patogênicas, apresentando manifestações agressivas (Naglick *et al.*, 2003; Sardi *et al.*, 2010).

A grande importância dessas leveduras encontra-se na alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano (Sardi *et al.*, 2010). Espécies de *Candida* são encontradas como microrganismos comensais no tubo gastrointestinal de 80% da população adulta saudável e cerca de 20 a 30% das mulheres apresentam colonização por *Candida* vaginal (Colombo & Guimarães, 2003).

Do ponto de vista taxonômico, localizam-se no Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* (Guarro *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, a prevalência de candidoses ou micoses causadas por espécies de *Candida* vem aumentando. Embora *C. albicans* seja a levedura considerada como a mais patogênica das espécies de *Candida*, uma variedade de outras espécies deste gênero tem sido citadas como agentes causadores de um

incremento no número de infecções (Ramage *et al.*, 2009; Barbedo & Sgarbi, 2010; Sardi *et al.*, 2010).

Somente cinco espécies de *Candida* eram conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var. *stellatoidea*) e *C. guilliermondii*. Recentemente, foram relatadas cerca de 17 espécies de *Candida* causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos. As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Além dessas, espécies emergentes de *Candida* têm sido relatadas de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas, incluindo *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, dentre outras (Colombo & Guimarães, 2003).

Ainda as variações geográficas significativas na etiologia de infecções invasivas por *Candida* spp. têm sido relatadas em diferentes países. Dentre as espécies não *albicans*, observa-se o predomínio de *C. glabrata* na América do Norte, já na América do Sul, observa-se predomínio de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Colombo & Guimarães, 2003).

C. albicans

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas, comprovada por diversos estudos (Colombo *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2008; Barbedo & Sgarbi, 2010; Sardi *et al.*, 2010). Como foi um dos primeiros fungos a ter seu genoma sequenciado, possibilitou um grande avanço biológico, principalmente na expressão dos seus genes. Essas descobertas possibilitaram maior conhecimento patogênico, e, conseqüentemente, a

descoberta de uma diversidade de fatores de virulência (Colombo & Guimarães, 2003; Magee & Magee, 2005).

Uma notável característica da biologia de *C. albicans* é a habilidade de crescer em uma variedade de formas morfológicas (Sudbery *et al.*, 2004). *C. albicans* é um organismo polimórfico o qual está submetido a transições morfológicas entre formas leveduriformes, hifas e pseudo-hifas (Villar *et al.*, 2004). A mudança na morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH. Mudanças na micromorfologia ocorrem em função da expressão genética, que se reflete na macromorfologia do desenvolvimento leveduriforme quanto à cor, que pode ser do branco ao creme, e ao aspecto, pastoso, brilhoso ou opaco. Porém, o estado leveduriforme pode evoluir para filamentoso, ou até mesmo uma mescla de células fúngicas leveduriformes e filamentosas (Sudbery *et al.*, 2004; Menezes *et al.*, 2005).

A habilidade em se transformar de levedura a formas filamentosas, é um dos mais importantes fatores de virulência deste microrganismo (Sudbery *et al.*, 2004; Villar *et al.*, 2004; Saville *et al.*, 2002; Berman & Sudbery, 2002). No entanto, esta virulência pode aumentar devido à presença de uma estrutura mista de comunidades similares às observadas no biofilme (Suci & Tyler, 2002). Assim, ambos estados filamentosos são invasivos, sendo esta propriedade determinante para a penetração nos tecidos durante os primeiros estágios da infecção (Sudbery *et al.*, 2004; Villar *et al.*, 2004; Järvensivu *et al.*, 2004), além de que todas as formas morfológicas deste fungo podem estar presentes no biofilme (Kunamoto *et al.*, 2002).

C. albicans, considerado um microrganismo comensal na cavidade bucal, pode aderir-se a outras espécies residentes, como *Streptococcus sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Porphyromonas gingivalis* (Bagg & Silverwood, 1986), e

Staphylococcus spp. (Martins *et al.*, 2002). Diversos estudos classificam a *C. albicans* como agente promotor da adesão de microrganismos, como *Streptococcus* spp, *E. coli* e *P. gingivalis* (Centeno *et al.*, 1983; Branting *et al.*, 1989; Nair e Samaranakaye, 1996). Estas interações estão ligadas a doenças bucais peculiares, como a periodontite (Reynaud *et al.*, 2001 Järvensivu *et al.*, 2004; da Cruz *et al.*, 2008), a periodontite apical (Slots *et al.*, 1988; Waltimo *et al.*, 2000), doenças periodontais necrosantes (Feller *et al.*, 2008), a necrose pulpar e a cárie dental (Raja *et al.*, 2010).

Além disso, também possui capacidade de adesão a superfícies plásticas (Samaranayake *et al.*, 1995; Panagoda *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1998) e de colonizar a hidroxiapatita como *S. mutans* (Nikawa *et al.*, 1998), capacidade de aderir ao epitélio e invadir o tecido conjuntivo gengival (Haynes, 2001), inibir a função de neutrófilos polimorfonucleares (Maccarinelli *et al.*, 2001), bem como produzir enzimas como colagenases e proteinases que são capazes de degradar imunoglobulinas (Hägewald *et al.*, 2002). Os fatores de virulência de *Candida* spp. associados à susceptibilidade do hospedeiro, poderiam desempenhar um papel importante em alterações inflamatórias associadas a outras doenças não apenas a candidose (Barros *et al.*, 2008).

Candida dubliniensis

C. dubliniensis foi identificada primeiramente em 1995, em Dublin, Irlanda. Considerada uma espécie de levedura patogênica fenotípica, genética e filogeneticamente semelhante à *C. albicans*. Apesar dessa similaridade, *C. albicans* é significativamente mais patogênica (Barbedo & Sgarbi, 2010).

Além disso, *C. dubliniensis* é também uma levedura oportunista e identificada e associada à candidose oral, especialmente em pacientes infectados pelo HIV com SIDA (Sullivan & Coleman, 1998). Além da cavidade bucal, essa

levedura tem sido isolada ainda do trato respiratório, vagina e trato gastrointestinal, e também de urina, escarro e feridas, estando implicada em infecções invasivas, mesmo em HIV-negativos, quando acometidos por doenças graves (Sullivan & Coleman, 1998; Jainkittivong *et al.*, 1998; Fotedar & Al Hedaithy, 2004).

C. dubliniensis pode ser encontrada em paciente diabéticos e na cavidade oral de uma minoria de indivíduos saudáveis. Apesar de pacientes com infecções sistêmicas por *C. dubliniensis* terem se recuperado, este incidente por *C. albicans* está bem longe de acontecer. *C. dubliniensis* é responsável por cerca de 2% das candidemias. As razões pela grande diferença entre a virulência de *C. dubliniensis* e *C. albicans* são alvos de investigações detalhadas. Recentemente se observou que *C. dubliniensis* tem a capacidade reduzida de produzir hifas, resultando assim em menores níveis de colonização e invasão tecidual (Sullivan *et al.*, 1998; Mc Manus *et al.*, 2008).

No Brasil, Milan *et al.* (2001) e Alves *et al.* (2001) analisaram pacientes infectados pelo HIV, determinando a prevalência de *C. dubliniensis* nessa população. Portela *et al.* (2004), na cidade do Rio de Janeiro, RJ, isolaram *C. dubliniensis* em sítios subgengivais de crianças infectadas pelo HIV.

Estudos são necessários para determinar a importância clínica precisa deste organismo, particularmente devido à sua capacidade de desenvolver rapidamente resistência a fluconazol *in vitro* (Sullivan & Coleman, 1998).

2.2 Candidose e fatores de virulência de *Candida* spp.

Diversos fatores contribuem para ocorrência de candidoses, dentre os quais se podem incluir o rompimento das barreiras cutâneas e mucosas, disfunção dos neutrófilos, falhas na imunidade mediada por células, desordem metabólica, exposição direta aos fungos, extremos de idade (recém-nascidos e

idosos), desnutrição aguda, longo tratamento com antibióticos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (Pfaller & Diakema, 2007).

Os microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas secundárias, por meio de queimaduras ou procedimentos médicos invasivos. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas na infância, como prematuridade, envelhecimento, doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (Colombo & Guimarães, 2003). Desse modo, a expressão gênica de *C. albicans* é regulada por uma interação entre hospedeiro e patógeno.

Na literatura específica, estudos avaliaram a habilidade de *C. albicans* em reverter a forma de levedura para formas filamentosas, a partir de estímulos ambientais. Há mecanismos sinalizadores que regulam a filamentação e virulência, como Ras, AMPc e PKA, além do papel do farnesol, considerada como molécula do "quorum sensing" (Ramage *et al.*, 2005; Hogan & Sundstron, 2009).

A hifa é a morfologia que melhor transpõe barreiras, devido ao seu desenvolvimento filamentosos, já a fase leveduriforme, por sua morfologia arredondada, é a melhor para a disseminação eficiente. Acredita-se que a produção de hifas aumente o poder de aderência e de invasão tecidual, permitindo às leveduras o acesso a estruturas e órgãos na profundidade do corpo (Caldeirone & Fonzi, 2001). A forma de levedura predomina durante a colonização no hospedeiro sadio, enquanto as hifas surgem frente à deficiência do sistema imune. Portanto, ambas as formas são de grande importância na patogênese, uma vez que elas são requeridas em diferentes situações no hospedeiro (Bronw & Grow, 1999).

A patogênese da candidose também é facilitada por outros fatores de virulência de *Candida* spp., envolvidos em múltiplas funções. A adesão de micro-

organismos às superfícies mucosas do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e subsequente estabelecimento da infecção nos tecidos mucosos (Challacombe, 1994). A aderência às células do hospedeiro pelas adesinas, como por exemplo a família do gene *ALS* (*agglutinin-like sequence*) em *C. albicans*, que codifica diferentes glicoproteínas de superfície celular implicadas no processo de adesão em superfícies do hospedeiro (Caldeirone & Fonzi, 2001).

Proteínas hidrofóbicas formadas por *C. albicans* na matriz polissacarídica também aumentam a força dos receptores de adesão, contribuindo para a patogenicidade dessa espécie de levedura (Masuoka *et al.*, 1997). Quanto mais hidrofóbicas, mais aderentes às células do hospedeiro e aos componentes salivares, como mucina e matriz de proteínas extracelulares (Masuoka *et al.*, 1999).

Além disso, estudos sugerem que a proteína SAP (aspartil proteinase secretada), produzida por *C. albicans*, é capaz de digerir a superfície da célula epitelial do hospedeiro, provocando invasão tecidual (Park *et al.*, 2005). As SAPs podem se adaptar e se envolver diretamente em várias funções de virulência. Essas proteínas podem contribuir para a adesão e invasão do tecido hospedeiro, degradando as estruturas da superfície da célula e substâncias intercelulares ou destruindo células e moléculas do sistema imune como uma maneira de resistir ao ataque da resposta imune do hospedeiro (Hube *et al.*, 2001).

No sistema imune esse microrganismo pode modular as defesas do hospedeiro, por meio de mananas e manoproteínas (Chaffin *et al.*, 1998), além de ter capacidade de sobrevivência dentro de fagócitos (Jong *et al.*, 2001) e adaptação ao ambiente oxidativo, em que genes de *C. albicans* são temporariamente induzidos ou reprimidos em função do óxido nítrico (Hromatka *et al.*, 2005). No sequestro de ferro, principalmente na candidíase hematogênica, *C. albicans* é capaz de adquirir o ferro a partir da transferrina (Knight *et al.*, 2005).

Essa capacidade de adaptação pode ser explicada pelo mecanismo de *quorum sensing*, que pode ser definido como um sistema complexo de comunicação intercelular por meio de sinalização molecular. A sinalização se dá em razão de flutuações ambientais, tais como diferença de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes, entre outros. Esse fenômeno ocorre porque espécies de *Candida* possuem sistemas que permitem sua adaptação em resposta a alterações ambientais (Whitehead *et al.*, 2001).

C. albicans possui toxinas, como candida-toxina (Buzzini & Martini, 2001) e pode expressar na superfície celular enzimas hidrolíticas. As principais enzimas produzidas são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos (Sardi *et al.*, 2010). A secreção de proteinases é capaz de degradar a matriz extracelular e componentes da membrana basal do epitélio, como o colágeno e a fibronectina. Dentre as importantes enzimas de *Candida* spp. que degradam tecidos estão as fosfolipases e aspartil proteinases secretadas (SAPs). Sete tipos de genes de fosfolipases (PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 e PLD1) e 10 de SAP (SAP1 a SAP10) têm sido identificados em *C. albicans* (Samaranayake *et al.*, 2006).

A habilidade de formar biofilmes também pode ser considerada um importante fator de virulência, já que se encontra intimamente associada à capacidade de causar infecções. Os biofilmes estão associados à resistência contra o sistema imune do hospedeiro e a antifúngicos. Os possíveis mecanismos incluem a restrita penetração das drogas através da matriz; variações fenotípicas resultantes de decréscimo do desenvolvimento ou limitações de nutrientes, indução de superfícies expressas por genes de resistência e pequeno número de células “persistentes”, responsáveis pela resistência (Ramage *et al.*, 2005; Uppuluri *et al.*, 2009).

Vale salientar que a patogenicidade não depende de um fator de virulência específico. A patogênese de *Candida* spp. está relacionada com a

expressão gênica, que ocorre de acordo com o estímulos ambientais da infecção, além de fatores ligados ao hospedeiro. Provavelmente a especificidade de candidoses junto aos diferentes sítios de infecção esteja associada a genes específicos de virulência. A adaptação do fungo *in vivo* possivelmente reflete sua variabilidade frente a microambientes e à natureza em que esses oportunistas sobrevivem (Uppuluri *et al.*, 2009).

Entretanto esse assunto precisa ser mais bem estudado, bem como a extensão com que os fatores de virulência contribuem para a colonização, ou para o processo de doença, que também necessita de melhores esclarecimentos (Uppuluri *et al.*, 2009).

2.2 Formação de Biofilme por *Candida* spp.

O biofilme representa o tipo mais prevalente de crescimento de microrganismos na natureza, sendo crucial para o desenvolvimento de infecções clínicas (Davey *et al.*, 2002). Aproximadamente 65% de todas as infecções tratadas encontram-se associadas com formação de biofilme sobre dispositivos médicos, tecidos e órgãos (Donlan *et al.*, 2001).

O biofilme, segundo Costerton e Lashen (1984), é produto do crescimento natural das bactérias em superfícies sólidas, em ecossistemas que contêm líquido. É uma comunidade/consórcio microbiano, embutida na matriz de polissacarídeo extracelular, resultante da aderência, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre superfícies sólidas (substrato), em ambiente líquido. Os microrganismos formam o biofilme como “estratégia universal” para otimizar sua sobrevivência, ou seja, para a perpetuação da espécie (Kolenbrander & London, 1993; Costerton *et al.*, 1995; Marsh, 2003), sendo constituídos por microrganismos de uma única ou de diversas espécies (Costerton *et al.*, 1995).

Atualmente, a espécie fúngica mais frequentemente associada ao biofilme em pacientes imunossuprimidos é *C. albicans* (Kunamoto, 2002; Ramage *et al.*, 2005). Além disso, é similar ao biofilme formado por outros microrganismos, mas com estrutura altamente dependente das condições sob a qual este esteja formado. Esta plasticidade sugere que o biofilme formado no hospedeiro depende da natureza do dispositivo implantado e da sua localização (Baillie *et al.*, 1999; Kunamoto, 2002). Todas as fases do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* são controladas por genes específicos de cada cepa (Ramage *et al.* 2009).

O biofilme de *C. albicans* desenvolve-se por meio de diferentes fases, incluindo adesão, proliferação, maturação e dispersão, num ciclo que pode ser repetido (Chandra *et al.*, 2001; Ramage *et al.*, 2005). Em biofilmes de *C. albicans* encontram-se leveduras, hifas verdadeiras e pseudo-hifas, adequadas para a colonização de superfícies inertes. A forma leveduriforme é a produtora de uma capa basal adesiva, e a forma filamentar a que provê o suporte para o desenvolvimento de uma estrutura multi-extrato (Baillie *et al.*, 1999).

A fase de adesão possui uma camada de células leveduriformes flutuantes a uma superfície e sobre estas uma camada de formas filamentosas rodeadas por uma matriz de polissacarídeos (Baillie & Douglas, 2000; Chandra *et al.*, 2001). Já o biofilme maduro é composto por uma rede de leveduras, hifas e pseudo-hifas submersas no material extracelular e ramificações de canais de água. Sua complexa arquitetura tridimensional e extensiva heterogeneidade espacial com micronichos representa uma otimização do espaço, para facilitar o afluxo de nutrientes entre os microrganismos e para eliminação dos metabólitos (Ramage *et al.*, 2004).

O material extracelular produzido pela espécie *C. albicans* contém carboidratos, proteínas e outros componentes ainda desconhecidos (Ramage *et al.*, 2005). Essa composição difere das células não aderidas (planctônicas) (Baillie e Douglas, 2000), sendo muito mais forte e estável quando o biofilme desenvolve-se

em meio aquoso, adquirindo, assim, alta resistência às drogas terapêuticas (Kunamoto, 2002).

Dispositivos implantados como cateteres, válvulas protéticas do coração, assim como dispositivos relacionados, permitem a este patógeno aderir-se à superfície e formar biofilme, aumentando os índices de infecção fúngica hospitalares (Costerton *et al.*, 1984; Dougherty *et al.*, 1988; Uppuluri *et al.*, 2009). O biofilme formado por *C. albicans* representa um problema crescente de saúde pública. Assim, o reconhecimento da importância do seu papel nas infecções pelos pesquisadores e pela comunidade médica levará a maiores avanços na sua prevenção, diagnóstico e tratamento (Uppuluri *et al.*, 2009).

2.3 Implicações clínicas da candidose

Candidose é uma micose de importância em saúde pública, que possui diversas espécies de *Candida* já reconhecidas como agentes causais. Embora a mais isolada e identificada seja *C. albicans*, diferentes espécies com características sutis ou maiores que as diferenciam, apresentam manifestações clínicas e micromorfologias similares (Ramage *et al.*, 2009; Barbedo & Sgarbi, 2010). Sua capacidade de adaptação a diferentes sítios anatômicos, juntamente com determinadas condições predisponentes do hospedeiro, podem causar ampla gama de danos ao paciente (Uppuluri *et al.*, 2009; Barbedo & Sgarbi, 2010).

Diversas espécies de *Candida* têm capacidade de disseminação, fazendo com que a candidose seja considerada uma doença infecciosa. Suas manifestações clínicas podem ser específicas a determinadas localidades anatômicas e sistêmicas, especialmente em pacientes imunodeprimidos, possuindo elevada taxa de mortalidade (Ramage *et al.*, 2009; Barbedo & Sgarbi, 2010).

O aumento da prevalência e da ocorrência de leveduras do gênero *Candida* em ambientes hospitalares torna-se um fator adicional de risco a saúde

dos pacientes. Em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (Uppuluri *et al.*, 2010).

Infecções por *Candida* envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas também podem ocorrer em pacientes saudáveis que possuam pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (Colombo & Guimarães, 2003).

As formas clínicas podem ser divididas em cutâneo-mucosas, sistêmicas e alérgicas. Na candidíase mucosa, os tecidos mais atingidos são os do trato digestório e as genitálias; na cutânea, as áreas intertriginosas da pele como virilhas, axilas e dobras da pele em geral, interdigitais das mãos e dos pés e as unhas; na sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando candidíase pulmonar, candidemia, endocardite, nefrite e outros, já a alérgica (candidíase) se caracteriza por diversos quadros, onde se observam lesões cutâneas do tipo vesiculosas a lesões eczematoides (Menezes *et al.*, 2004).

Existem várias evidências e trabalhos que sugerem que a infecção da corrente sanguínea por *Candida* é um grande problema na maioria dos hospitais em todo o mundo. A candidemia é observada particularmente entre pacientes hospitalizados por longos períodos que são expostos a antibióticos, terapias imunodepressivas e procedimentos clínicos que envolvem biomateriais, como nutrição parenteral, e procedimentos invasivos múltiplos, que são base para formação de biofilme (Ramage *et al.*, 2009).

A fungemia por *Candida* é geralmente difícil de diagnosticar, o tratamento é de alto custo e existe uma alta taxa de mortalidade. Atualmente é a terceira ou quarta causa mais frequente dentre as infecções hospitalares (Colombo *et al.*, 2006; Pfaller & Diekema, 2007; Tumbarelo *et al.*, 2007). Dentre as manifestações clínicas, a febre é a mais comum, porém as infecções podem tomar diversas formas e localizações (septicemia, pneumonia, endocardites, artrite, osteomielites, miosites, peritonites, meningites, dentre outras) (Colombo *et al.*, 2006).

2.4 Resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos

A sensibilidade aos azólicos mostrou-se variável, ocorrendo resistência cruzada. Esse fato vem corroborar com recentes dados, que indicam uma crescente resistência aos antimicrobianos azólicos entre espécies de *Candida*, sugerindo que a cavidade oral poderia ser um reservatório de leveduras resistentes (Dronda *et al.*, 1996; Mahboubi & Haghi, 2008).

O uso difundido de antifúngicos azólicos para tratamento de candidose oral, principalmente após a era SIDA, parece ser um fator preponderante no aumento da frequência de espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente aquelas naturalmente mais resistentes a esta classe de antifúngicos. O fluconazol é ativo contra a maioria das espécies de leveduras, porém existem algumas exceções como os isolados de *C. krusei* e *C. norvegensis*, que são resistentes, e alguns de *C. glabrata*, que possuem a sensibilidade reduzida (Dronda *et al.*, 1996). *C. dubliniensis* também apresentou resistência ao fluconazol *in vitro* (Sullivan & Coleman, 1998).

Vale ressaltar, que alguns estudos sugerem que o tratamento prolongado ou intermitente com antifúngicos, também modifica a prevalência de *C. albicans*, aumentando a frequência de outras espécies de *Candida* (Persons *et al.*, 1991; Millon *et al.*, 1994).

Relatos da literatura específica têm demonstrado que a maioria das espécies de *Candida* é sensível a antifúngicos azólicos e poliênicos. Todavia, a echinocandina, uma nova classe de antifúngico, que age por meio da inibição da síntese de glucano da parede celular dos fungos apresenta excelente atividade antibiofilme em concentrações terapêuticas (Ramage *et al.*, 2005).

Particularmente *C. albicans* é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes expostos prolongadamente a estes medicamentos. Quanto à resistência a anfotericina B, os relatos são mínimos (Colombo & Guimarães, 2003; Magee & Magee, 2005; Tiraschi *et al.*, 2007).

A resistência a drogas antifúngicas por *C. albicans* é considerada multifatorial. Seus mecanismos incluem o estado metabólico e fisiológico das células fúngicas; elevada densidade celular no biofilme; o efeito protetor da matriz do biofilme, através dos glucanos que se ligam as moléculas antifúngicas (azólicos); expressão alterada de genes relacionados à resistência, como os que codificam bomba de efluxo; diferenças na composição do esterol da parede celular da membrana; e a presença de uma subpopulação de células “persistentes” (Ramage *et al.*, 2005).

Por isso, é importante que se realize uma correta identificação da espécie e a prova de suscetibilidade para antifúngicos. Essas são informações necessárias no que se refere à provável sensibilidade no tratamento das candidemias (Sanven, 2000).

2.4 Atividade antimicrobiana das plantas medicinais

O conhecimento empírico das propriedades medicinais das plantas tem sido a base para a fabricação e uso de remédios caseiros. No entanto, o interesse

do potencial clínico e farmacológico dessas substâncias, além da segurança de uso, tem aumentado, por conta da automedicação de produtos de plantas medicinais e seus efeitos sistêmicos (Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007).

Apesar de muitos profissionais de saúde acreditar que os produtos derivados de plantas medicinais são seguros, simplesmente pelo fato de serem “naturais”, publicações recentes têm demonstrado conseqüências severas dos seus efeitos sistêmicos (Gurib-Fakin, 2006; Bush *et al.*, 2007).

Muitas alterações ambientais podem afetar a planta, por meio de diversos mecanismos, incluindo contaminações e, tendo como conseqüência efeitos tóxicos e interações com outras drogas e ervas (Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007). Essa contaminação pode ser causada por produtos herbais, metais pesados, como chumbo, mercúrio ou arsênio (Gagnier *et al.*, 2006), de forma proposital e ilegalmente adicionados aos produtos medicinais, além de microrganismos, toxinas microbianas, fatores genéticos (Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007), que podem alterar o metabolismo da planta e sua resposta medicinal, trazendo riscos à saúde do paciente.

Além disso, o uso indiscriminado de drogas antimicrobianas tem ocasionado seleção de cepas resistentes. Com isso, houve um estímulo na busca por novas substâncias com propriedades antimicrobianas que venham colaborar na terapêutica de doenças, inclusive na prática odontológica (Kunamoto, 2002; Jewtuchowicz *et al.*, 2007).

O uso de plantas como fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde, estando bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (Shale *et al.*, 1999; More *et al.*, 2008). Muitas plantas nativas dessas regiões ainda não foram estudadas e podem ser pesquisadas para ação antimicrobiana, em contraste com plantas da Europa, que já foram bastante estudadas.

As informações disponíveis sobre plantas medicinais ativas contra a levedura *C. albicans* não resultou, até o momento, em formulações para uso humano ou animal, exceto algumas patentes utilizando material derivado de plantas da família do *Allium* (Plummer, 1992), de *Radix gentianae* (Chen, 1996) e cinco extratos estudados por Lee *et al.* (2003).

Recentemente, vários grupos de pesquisadores de diferentes países têm estudado a inibição de *C. albicans* por extratos, óleos essenciais e substâncias isoladas de plantas. Em muitos países, tais como Índia, África e países da América Latina, a maioria dos trabalhos começa a partir de um levantamento etnofarmacológico, que descrevem as espécies mais freqüentes usadas pela população. Alguns países da América Latina têm mantido programas de pesquisa para triagem de plantas medicinais com atividade antimicrobiana, como é o caso de Cuba (Martinez *et al.*, 1996), Honduras (Lentz *et al.*, 1998) e México (Navarro *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 2001), além de regulamentarem por meio da criação de banco de dados para que haja uma preservação do conhecimento.

No Brasil, apesar da rica flora e biodiversidade existente, somente dados a partir de cerca de 44 espécies e 22 famílias com atividade positiva estão disponíveis, incluindo plantas nativas e exóticas (Duarte *et al.* 2005). Embora a maioria dos trabalhos refira-se a apresentações em congressos nacionais, o número de trabalhos desenvolvidos no Brasil, indexados ou não, é similar àqueles produzidos na América Latina e Ásia.

No Brasil, a maior parte das pesquisas refere-se a testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseadas em informações etnofarmacológicas, diferentemente dos trabalhos que enfocam a flora de uma dada região, onde várias famílias botânicas são estudadas. Um amplo estudo seria mais efetivo, principalmente se a investigação abrangesse o potencial farmacológico de espécies de um determinado gênero, guiado pelo uso popular, como o estudo desenvolvido por Silva e Cechinel (2002) para plantas do gênero

Bauhinia spp. Os autores estudaram a composição química e farmacológica de 16 extratos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Entretanto, nenhuma atividade foi encontrada contra *C. albicans*.

Em nosso estudo a *Mentha* spp será avaliada por apresentar propriedades antifúngicas e antimicrobianas (Sivropoulou *et al.*, 1995; Sartoratto *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Yadegarinia *et al.*, 2006).

2.5 *Mentha* spp.

Considerada uma erva perene, o gênero *Mentha* engloba as espécies *M. piperita*, *M. spicata* e *M. aquatica*. Apesar da origem européia, foi inicialmente introduzido no nordeste dos Estados Unidos e Canadá, sendo atualmente cultivado em todo o mundo, devido à utilização como flavorizante, fragrância, uso medicinal, e aplicações farmacêuticas (McKay & Blumberg, 2006).

Entretanto, muitas das práticas fitoterápicas têm sido baseadas no folclore e no empirismo, ao invés de utilizar bases científicas para a prática clínica (McKay & Blumberg, 2006). Assim, espécies pertencentes ao gênero *Mentha* estão entre os ingredientes de chás e de remédios populares como terapia alternativa para o tratamento de doenças como desordens biliares, dispepsia, enterites, gastrites, entre outras (McKay & Blumberg, 2006). Além disso, seu óleo essencial é utilizado em formulações de produtos cosméticos (Nair, 2001), suplementos alimentares (Friedman, 1991), possuindo ação laxante sobre a musculatura lisa do trato gastrointestinal (Kaffenberger & Doyle, 1990). Ainda, é utilizado como expectorante e inalante, descongestionante, enxaguatório bucal e digestivo, apesar da FDA (1992) afirmar que o óleo da *Mentha* spp. não é seguro nem efetivo para esses fins.

Os componentes químicos do óleo de *Mentha* spp. variam de acordo com idade da planta, variedade da espécie, região geográfica, clima e condições do

processamento (Spirling & Daniels, 2001; Xu *et al.*, 2003; Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007). Os principais elementos voláteis identificados no óleo essencial da *Mentha* spp. são mentol (33-60%), mentona (15-32%), isomentona (2-8%), 1,8 cineol (eucaliptol) (5-13%), acetato de metila mentil (2-11%) mentofurana (1-10%), limoneno (1-7%), β -mirceno (0,1-1,7%), β -cariofileno (2-4%), pulegona (0,5-1,6%) e carvona (1%) (Pitter e Ernest, 1998).

Desses elementos, o mentol e a mentona têm se destacado em diversos estudos por ser apontado como frações ativas do óleo essencial da *Mentha* spp. Sua atividade antimicrobiana varia não apenas em relação ao diferente acesso da *Mentha*, mas também em relação às diferentes cepas de uma mesma espécie bacteriana (Sivropoulou *et al.*, 1995; Mahady *et al.*, 2005). O óleo essencial de diferentes espécies de *Mentha* spp. apresenta atividade antimicrobiana para diversas bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* (Sivropoulou *et al.*, 1995; Sartoratto *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Yadegarinia *et al.*, 2006).

Quando comparados o mentol e a mentona, Furahata *et al.* (2000) e Iscan *et al.* (2002), em estudo realizado *in vitro*, sugerem que o mentol seja o responsável pela atividade antimicrobiana desses óleos. O mentol demonstrou atividade antimicrobiana contra diversas espécies bacterianas, como *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Comamonas terrigena* (Schuhmacher *et al.*, 2003). Ainda, há evidências científicas que sugerem sua ação protetora contra o vírus do herpes simples (Melzer *et al.*, 2004).

Já Mahady *et al.* (2005) testaram o efeito bactericida da mentona sobre 15 cepas de *E. coli*, atestando a susceptibilidade dessas espécies.

Na literatura, diversos estudos comprovam sua eficácia antifúngica, inclusive contra a *Candida* spp. (Oumzil *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2004; Sartoratto *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Tampieri *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

Quanto à segurança de uso, o óleo essencial da *Mentha* spp. foi relatado por Nair (2001) como seguro na aplicação em formulações cosméticas, sendo a pulegona limitado à concentração de 1%, devido à toxicidade em maiores concentrações. A pulegona é considerada uma substância hepatotóxica. Por isso, quando aplicado juntamente com drogas da “medicina convencional”, pode produzir interações farmacocinéticas, alterando os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, ou alterações farmacodinâmicas. Evidências científicas sugerem que o óleo essencial de *Mentha* spp. pode interagir com isoformas do Citocromo P-450, como CYP 1 A2, CYP 2C19, CYP P2C9, CYP 3 A4, e modificar a quantidade de drogas metabolizadas por esses citocromos (Maniacal & Wanwimolruk, 2001). Essa interação possui grande importância na prática clínica. As isoenzimas do citocromo P-450 metabolizam um elevado número de drogas e substâncias químicas naturais ou sintéticas. Além disso, há polimorfismos genéticos consideráveis na estrutura das drogas e em diferentes populações, assim como a dificuldade de avaliar a variabilidade na potência e complexidade de preparações de drogas fitoterápicas, além do que apontam para o cuidado com suas interações com outras drogas e substâncias (Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007).

Apesar da baixa toxicidade do óleo, há alguns casos descritos de sensibilidade tópica (Bonamonte *et al.*, 2001). No entanto, Kanerva *et al.* (2001), em estudo realizado em 4000 pacientes, não encontrou casos de irritações cutâneas ou alergias.

Vale ressaltar que o óleo essencial de *Mentha* spp. pode conter diversos compostos ativos em proporções danosas à saúde, associados com azia, náusea, vômito, reações alérgicas, inflamações e dores de cabeça (Maniacal & Wanwimolruk, 2001; Akdogan *et al.*, 2004; Bush *et al.*, 2007).

Em estudo realizado para avaliação do seu potencial carcinogênico em dentifrícios, não foi observada diferença entre os ratos tratados com óleo essencial e aqueles tratados com pasta-base (Nair, 2001).

Aprovado para uso interno, o óleo da *Mentha* spp. é utilizado para eventos de desconfortos do trato gastrintestinal superior e ductos biliares, irritações do cólon ou irritações da síndrome de Bowel, expectorante, mialgia e neuralgia, além de inflamação da mucosa bucal. Deste modo, estudos que demonstrem evidências científicas que aprovem ou recusem a utilização em humanos do óleo da *Mentha* spp. são necessários (McKay & Blumberg, 2006).

2.6 Coleta e extração de óleos essenciais

É essencial que se prepare uma exsicata para a identificação botânica e que a seleção do material coletado seja realizada com cuidado, evitando coletar partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e materiais estranhos, tais como outras plantas ou partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação. Deve-se registrar o local, a hora e a data da coleta, já que o meio, a hora do dia e a época do ano exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo de metabólitos vegetais (Falkenber *et al.*, 2003). Devem ser coletadas, preferencialmente, as plantas ricas em óleos voláteis bem cedo, pela manhã, ou à noite, pois o período de exposição à luz solar pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo (Simões & Spitzer, 2003).

O uso do material vegetal fresco, como no estudo de Sivropoulou *et al.* (1995), Sartoratto *et al.* (2004), Lee *et al.* (2007) e Mahboubi & Haghi (2008) tem como vantagem a detecção de alguns componentes específicos e evitar a presença de substâncias originadas do metabolismo de fenecimento vegetal (Falkenber *et al.*, 2003). Quando a planta não puder ser processada imediatamente, pode ser conservada a baixas temperaturas, de acordo com os mesmos autores.

Na extração do óleo essencial, primeiramente deve ser realizada a moagem. Segundo Falkenber *et al.* (2003), a moagem tem por finalidade reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o para a extração do óleo. Durante a extração do óleo essencial, o grau de divisão dos materiais também deve ser considerado. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a ser extraído, é necessário considerar que quanto mais rígido for o material, menor deve ser sua granulometria. A moagem aumenta a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, aumentando a eficácia do procedimento. A escolha das dimensões apropriadas depende também da textura do órgão vegetal. Quanto mais rígidos forem os tecidos, maior será o grau de divisão necessário (Falkenber *et al.*, 2003). No caso da parte aérea da *Mentha* spp., que possui uma textura mais delicada, o tamanho do vegetal poder ser reduzido por seccionamento com tesouras, utilizada grosseiramente. Segundo Falkenber *et al.* (2003), a tesoura pode ser indicada nesses casos.

A escolha de um método extrativo envolve sua eficiência, a estabilidade das substâncias a serem extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, a extração concomitante de vários tipos de substâncias ocorre com frequência. Essas substâncias podem ser farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. De acordo com esses critérios, pode-se escolher o método e o solvente que serão empregados (Falkenber *et al.*, 2003). A extração do óleo essencial de *Mentha* spp. pode ser realizada por meio de hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, método indicado para extrair óleos de plantas frescas (Simões & Spitzer, 2003).

Nesse método, os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água, através do processo empregado. Em seguida, o óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio anidro, como realizado no presente estudo e por

Sivropoulou *et al.* (1995), Oumzil *et al.* (2002), Sartoratto *et al.* (2004), Duarte *et al.* (2005), Wannissorn *et al.* (2005), Lee *et al.* (2007), Mahboubi & Haghi (2008), Rosato *et al.* (2008) e Tavares *et al.*, (2008). Esse procedimento, embora clássico, pode levar a formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Por isso, a Farmacopéia Brasileira IV preconiza o uso do aparelho tipo Cleavenger com modificações (Simões & Spitzer, 2003).

Além disso, o solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível, para que se possam extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente a ser utilizado para obter uma ótima extração (Falkenber *et al.*, 2003). O diclorometano possui polaridade adequada para extração do óleo essencial de *Mentha* spp. O solvente apolar diclorometano pode ser usado para extrair a parte orgânica dos óleos essenciais de *Mentha* spp. Os solventes apolares extraem outros compostos lipofílicos além dos óleos voláteis (Simões & Spitzer, 2003).

O óleo essencial de *Mentha* spp. possui amplo valor comercial, inclusive pela indústria farmacológica (Oumzil *et al.*, 2002; McKay & Blumberg, 2006). Utilizado para preparações farmacêuticas, no tratamento de distúrbios gastrintestinais, expectorante, mialgia e neuralgia, o óleo também é empregado como flavorizante e aditivo em alimentos e em produtos de higiene bucal (McKay & Blumberg, 2006).

Esse método proporciona a extração de diversos componentes do óleo essencial dos diversos acessos de *Mentha* spp., como o mentol e a mentona. Inclusive substâncias indesejadas, por seus efeitos hepatotóxicos, reações alérgicas, vômitos e dores de cabeça, entre outros, como a pulegona e o mentofurano, também podem ser extraídas (Xu *et al.*, 2003; Akdogan *et al.*, 2004; Bush *et al.*, 2007). A literatura específica comprova que essas substâncias entre outras compõem os óleos essenciais de *Mentha* spp. (Iscan *et al.*, 2002; Xu *et al.*,

2003; Rodriguez-Fragoso *et al.*, 2007). A identificação e a proporção de cada componente nos óleos essenciais pode ser verificada por meio de uma metodologia mais peculiar, como as cromatografias.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, responsáveis pela fragrância e efeitos biológicos das plantas medicinais aromáticas (Angioni *et al.*, 2003; Simões & Sptizer, 2003). Sua principal característica é a volatilidade e o aroma agradável e intenso sendo, por isso, também chamado de essências. São solúveis em solventes orgânicos como éter, sendo que em água apresentam solubilidade limitada, mas suficientes para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos. Esses óleos de forma geral não são muito estáveis, principalmente na presença de água, luz, calor, umidade e metais. Por isso devem ser conservados dessecados (secos com Na₂SO₄ anidro) e livres de impurezas insolúveis (Simões & Sptizer, 2003; Lee *et al.*, 2007).

Por conta disso, devem ser guardados em frascos de pequeno volume, em embalagens neutras, feitas de alumínio, aço inoxidável, vidro âmbar, completamente cheios e hermeticamente fechados, que devem ser estocados a baixas temperaturas ou, preferencialmente, em atmosferas de nitrogênio. O emprego de recipientes plásticos apresenta problemas de permeabilidade e adsorção de componentes dos óleos voláteis. Dependendo da destinação do produto, pode-se adicionar um agente antioxidante (Simões & Sptizer, 2003) soluções como Tween 80, a qual auxilia na estabilização do produto (Rios *et al.*, 1988).

Os óleos da Família Lamiaceae originam-se de estruturas glandulares especializadas, tais como pelos glandulares. Entretanto, sua composição química, mesmo quando extraída do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar em função da época da coleta, das condições climáticas e do solo (Xu *et al.*, 2003; Mahboubi & Haghi, 2008).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. A hortelã-pimenta (*Mentha x piperita L.*) quando cultivada em períodos de dias longos e noites curtas, apresenta um maior rendimento do óleo, com teor aumentado de mentofurano; ao contrário, noites frias, favorecem a formação do mentol. O grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode prever ou estabelecer um padrão único, cada espécie reage de forma diferenciada (Spirling & Daniel, 2001; Xu *et al.*, 2003; Mahboubi & Haghi, 2008).

3 Proposição

O presente estudo teve como proposta geral avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes acessos de *Mentha* spp. contra *Candida* spp.

As propostas específicas foram:

- Determinar os valores de rendimento em óleo essencial dos diferentes acessos de *Mentha* spp. estudados;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos óleos essenciais dos acessos de *Mentha* spp.;
- Determinar a ação dos óleos essenciais de melhor atividade antifúngica sobre o biofilme de *C. albicans*;
- Realizar análises microscópicas que demonstrem a redução do biofilme formado por *C. albicans*;
- Identificar as substâncias dos monoterpenos presentes nos óleos de melhor atividade antifúngica por métodos cromatográficos;
- Determinar a citotoxicidade das frações de melhor atividade em cultura de células epiteliais.

4 Material e Métodos

O fluxograma do presente estudo encontra-se no Anexo I, para melhor entendimento da sequência da sua metodologia.

4.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais escolhidas para estudo no presente projeto pertencem à Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas – CPMA*, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, sendo espécies adaptadas à nossa região (Tabela 1). Durante o estudo, as plantas foram cultivadas sob a responsabilidade da engenheira agrônoma do CPQBA, Dra. Glyn Mara Figueira, de modo padronizado, numa estufa e avaliadas quanto à fase de desenvolvimento e época adequada para colheita, sempre realizada pela manhã (Anexo III).

4.2 Obtenção dos óleos essenciais das plantas

Para obtenção dos óleos essenciais, foram utilizadas amostras das partes aéreas das plantas frescas. A extração dos óleos foi realizada por hidrodestilação em sistema do tipo Clevenger, pesando-se cerca de 200 g das partes aéreas da planta fresca em balão de fundo redondo de 1000 mL, adicionando-se 700 mL de água destilada e procedendo-se à destilação por 3 horas. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 50 mL) e a fase orgânica obtida submetida à secagem com sulfato de sódio anidro, filtrada sob algodão e o solvente evaporado à secura (Anexo IV).

*A CPMA/CPQBA foi credenciada junto ao CGEN como fiel depositária de amostras de componentes do patrimônio genético através da deliberação do CGEN no. 82 de 09/12/2004. Publicada no DOU em 08/03/2005

Tabela 1. Acessos de *Mentha* spp. pertencentes à CPMA do CPQBA/UNICAMP, que foram utilizados no presente estudo.

Código (BRA)	Código Local	Nome científico	Nome popular	Procedência
000221	CM 1	<i>Mentha aquática</i> L.	Menta limão	Univ. Purdue USA
000230	CM 2	<i>Mentha</i> sp. x <i>m. villosa</i> Huds	Menta maçã	Univ. Purdue USA
000248	CM 3	<i>Mentha x piperita</i> L.	Menta chocolate	Univ. Purdue USA
000256	CM 4	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	Menta abacaxi	Univ. Purdue USA
000264	CM 5	<i>Mentha canadensis</i> L.	Menta chinesa	Univ. Purdue USA
000272	CM 6	<i>Mentha piperita</i> L.	Menta chiclete	Univ. Purdue USA
000299	CM 8	<i>Mentha piperita</i> L.	Menta água de colônia	Univ. Purdue USA
000302	CM 9	<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã variegata	Univ. Purdue USA
000311	CM 10	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. x <i>M. aquatica</i>	Menta doce limão de Hillary	Univ. Purdue USA
000329	CM 11	<i>Mentha piperita</i> L.	Menta verde crespa	Univ. Purdue USA
000337	CM 13	<i>Mentha aquatica</i> L.	Menta laranja	Univ. Purdue USA
000345	CM 16	<i>Mentha piperita</i> L.	Menta persa do campo	Univ. Purdue USA
000353	CM 17	<i>Mentha spicata</i> L.	Menta mentol GH	Univ. Purdue USA
000361	CM 18	<i>Mentha aquatica</i> L.	Menta comum GH	Univ. Purdue USA
000370	CM 19	<i>Mentha aquatica</i> L.	Menta lavanda	Univ. Purdue USA
000388	CM 20	<i>Mentha canadensis</i> L.	Menta japonesa do campo	Univ. Purdue USA
000396	CM 22	<i>Mentha x gracilis</i> Sole	Bergamota	Univ. Purdue USA
000400	CM 23	<i>Mentha x piperita</i> L.	Hortelã	Univ. Purdue USA
000418	CM 24	<i>Mentha arvensis</i> L.	Menta gengibre	Univ. Purdue USA
000426	CM 25	<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã de folha larga	Univ. Purdue USA
000434	CM 26	<i>Mentha arvensis</i> L.	Menta banana	Univ. Purdue USA
000442	CM 27	<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Menta prata do Himalaia	Univ. Purdue USA
000451	CM 28	<i>Mentha</i> sp. x <i>M. villosa</i> Huds.	Menta egípcia	Univ. Purdue USA
000469	CM 29	<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã caseira	Distrito Federal
000477	CM 30	<i>Mentha spicata</i>	Menta do Uruguai	Uruguai
000485	CM 31	<i>Mentha spicata</i> L.	Emater 1	UnB
000493	CM 32	<i>Mentha piperita</i> L.	Cidade do Leste	UnB
000507	CM 33	<i>Mentha spicata</i> L.	UnB 1	UnB
000515	CM 34	<i>Mentha sylvestris</i> L.	Emater 2	UnB
000523	CM 35	<i>Mentha rotundifolia</i> (L.) Huds.	Dourados 1	UnB
000531	CM 36	<i>Mentha arvensis</i> L.	Dourados 2	UnB
000540	CM 37	<i>Mentha campestris</i> Schur	Emater 3	UnB
000558	CM 38	<i>Mentha</i> sp x <i>M. villosa</i> Huds.	Kibe	UnB
000566	CM 39	<i>Mentha piperita</i> L.	Piperita negra	UnB
000574	CM 40	<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	Hortelã branca	UnB
000582	CM 41	<i>Mentha spicata</i> L.	Hortelã vilosa 400	CPQBA
000591	CM 43	<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã 560	CPQBA
000604	CM 44	<i>Mentha x piperita</i> subsp. <i>Citrata</i>	Hortelã 489	CPQBA
000612	CM 45	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	Hortelã branca 500	CPQBA
000621	CM 46	<i>Mentha arvensis</i> L.	Hortelã 403	CPQBA
000639	CM 47	<i>Mentha</i> spp.	Hortelã 1802	São Paulo

000655	CM 49	<i>Mentha</i> spp.	IAC 1	IAC
000663	CM 50	<i>Mentha</i> spp.	IAC 2	IAC
000671	CM 51	<i>Mentha</i> spp.	IAC 3	IAC
000680	CM 52	<i>M. suaveolens x spicata</i>	IAC 4	IAC
000698	CM 53	<i>Mentha</i> spp.	IAC 5	IAC
000701	CM 54	<i>Mentha</i> spp.	IAC 6	IAC
000710	CM 55	<i>Mentha</i> spp.	IAC 7	IAC
000728	CM 56	<i>Mentha</i> spp.	IAC 8	IAC
000736	CM 57	<i>Mentha</i> spp.	IAC 9	IAC
000744	CM 58	<i>Mentha</i> spp.	Hortelã feltrini	Sementes comerciais
000060	CM 59	<i>Mentha arvensis</i> L.	IAC 701	Paraná
000752	CM 60	<i>Mentha aquatica</i> L.	K 78195	Kew Garden Inglaterra
000761	CM 61	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	K 69652	Kew Garden Inglaterra
000779	CM 62	<i>Mentha</i> spp.	Hocaido	Paraná
000787	CM 63	<i>Mentha</i> spp.	Poejo Botucatu	UNESP
000795	CM 64	<i>Mentha</i> spp.	Hortelã Botucatu	UNESP
000809	CM 65	<i>Mentha sp. x M. Villosa</i> Huds.	UFC 1	UFC
000817	CM 66	<i>Mentha arvensis</i> L.	UFC 2	UFC
000825	CM 67	<i>Mentha x piperita</i> subsp. <i>Citrata</i>	UFC 3	UFC
000833	CM 68	<i>Mentha rotundifolia</i> (L.) Huds.	UFC 4	UFC
000841	CM 69	<i>Mentha piperita</i> L.	UFC 5	UFC
000850	CM 70	<i>Mentha</i> spp.	CA 1	Minas Gerais
000876	CM 72	<i>Mentha</i> spp.	CA 3	Minas Gerais

IAC = Instituto Agronômico de Campinas; UnB = Universidade de Brasília; CPQBA = Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/UNICAMP; UFC = Universidade Federal do Ceará; UNESP = Universidade Estadual de São Paulo; MG = Minas Gerais; DF = Distrito Federal; SC = Sementes Comerciais; KG = Kew Garden, Inglaterra; SP = São Paulo.

4.3 Determinação do rendimento em óleo essencial de *Mentha* spp.

Foi determinado o teor dos óleos essenciais em relação à massa de planta fresca e seca.

Para fim de cálculos de rendimento, amostras das plantas foram submetidas à secagem a 40 °C, em estufa com circulação de ar, até que estas apresentassem peso constante.

4.4 Microrganismos

Foram utilizadas cepas de referência de duas espécies de *Candida* spp. (Quadro 1), pertencentes à coleção Holandesa CBS, e isolados clínicos de pacientes com doença periodontal, saudáveis sistemicamente, coletados e isolados na clínica de periodontia da FOP/UNICAMP (Quadro 2). O presente estudo foi realizado sob o Comitê de Ética 060/2008 (Anexo II). A cepa de *C. albicans* SC 5314 foi utilizada nos ensaios com biofilme. A levedura pertence à coleção do Departamento de Biologia da Universidade do Texas de San Antonio – UTSA.

Quadro 1- Cepas de referência de *Candida* spp.

CBS-562	<i>C. albicans</i>
CBS-7987	<i>C. dubliniensis</i>
SC-5314	<i>C. albicans</i>

Quadro 2- Isolados clínicos de pacientes sistemicamente saudáveis.

Nº amostras	Espécie
4	<i>C. albicans</i>
3	<i>C. dubliniensis</i>

Número de voluntários = 7

Os isolados clínicos foram coletados da bolsa periodontal e identificados através do cultivo em meio cromogênico CHROMagar-*Candida* e por testes morfológicos, bioquímicos de fermentação e assimilação de carboidratos (API) e por PCR. Posteriormente, foram armazenados a -70 °C em meio YPD-Glicerol a 15 % na Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP.

As formulações das soluções encontram-se no anexo V.

4.5 Meios de cultura

As composições dos meios de cultura utilizados nesse estudo encontram-se disponíveis no anexo V.

Meio para manutenção: Ágar Sabouraud Dextrose

Meio para testes de atividade antimicrobiana: RPMI-1640.

Meio para testes com biofilme: Yeast Peptone Dextrose (YPD) e RPMI-1640.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição (CLSI, 2002)

Os óleos essenciais dos 64 diferentes acessos de *Mentha* spp. foram testados em células planctônicas de *C. albicans* (CBS 562) e *C. dubliniensis* (CBS 7987), além dos isolados clínicos utilizados nesse estudo.

Preparo do inóculo:

O inóculo foi preparado em solução salina, comparando-se a turbidez com a escala Mc Farland (0,5), equivalente a uma absorbância de 0,08 a 0,10 a 625nm e a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL no espectrofotômetro. O inóculo foi padronizado a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços, foram depositados 100 μ L de caldo RPMI-1640, com exceção da coluna 12, utilizada para os controles. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 μ L de óleo essencial a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna). Em seguida, 100 μ L do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 μ L finais foram desprezados. Em seguida, 100 μ L da suspensão de inóculo da

levedura, preparado conforme descrito acima foram adicionados. As placas foram seladas com parafilm e incubadas por 48 h à 37 °C. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do óleo capaz de impedir o crescimento visível da levedura, avaliado através da mudança de coloração do meio RPMI-1640, de rosa para amarelo.

Foi também incluído nos testes o antifúngico comercial como controle Nistatina (Merck®), além do controle para confirmação da esterilidade do meio de cultura e controle do crescimento do microrganismo.

4.7 Fracionamento dos óleos essenciais de melhor atividade em cromatografia de coluna seca

Os óleos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana em células planctônicas de *Candida* spp. foram fracionados em cromatografia de coluna seca.

As colunas secas foram preparadas com sílica gel 60 Merck (0,063 – 0,200 mm), utilizando-se como suporte membrana de celulose de 3 cm de diâmetro e 0,5 g dos óleos essenciais. As colunas foram empacotadas até 25 cm de altura, seguido da adição e eluição do óleo essencial diretamente na coluna. A fase móvel utilizada em cada coluna foi definida após análise dos óleos essenciais por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em diferentes eluentes, sendo diclorometano o eluente escolhido.

Após eluição, as colunas foram divididas em 5 partes e as frações foram transferidas individualmente para frascos adequados e analisadas por CCD. Como eluente foi utilizado diclorometano e como revelador, solução de anisaldeído (solução de ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído; 50:1:0,5). Em seguida, as semelhantes foram agrupadas e filtradas à vácuo, extraíndo-se os resíduos da sílica.

4.8 Análise dos óleos por cromatografia em camada delgada (CCD)

Os óleos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana em células planctônicas de *Candida* spp. foram analisados por CCD. em cromatoplasmas de silicagel (60 F254 Merck 1.05554). As cromatoplasmas foram eluídas em sistemas de solventes utilizando diclorometano.

Essa análise também possibilitou escolher o eluente que melhor se combinou às substâncias dos óleos essenciais e, conseqüentemente, a fase móvel que foi utilizada na Cromatografia de Coluna Seca.

4.9 Formação do biofilme e testes com agentes antifúngicos, de acordo com Pierce *et al.* (2008)

Os óleos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana em células planctônicas de *Candida* spp. foram testados em biofilme de *C. albicans* (SC 5314), juntamente com suas respectivas frações. Foram utilizadas 5 frações de cada óleo.

Inicialmente, a cultura a ser utilizada foi preparada 24 horas antes do experimento. *Candida albicans* SC 5314 foi inoculada em frasco contendo YPD (Yeast Peptone Dextrose) e incubada sob agitação a 180 rpm e 30 °C, *overnight*. Em seguida, 7 mL da cultura foi centrifugada e lavada 2x com solução tampão de salina fosfatada (PBS). Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 7 mL de RPMI-1640 a 37 °C ao precipitado e mesclado em vortex. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, sendo as células contadas em hemocitômetro, em microscópio óptico (aumento de 400x). Após a contagem foi calculado o volume necessário para obter uma suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células/mL, em RPMI-1640. Com o inóculo padronizado, os biofilmes foram produzidos em placas esterilizadas de polietileno de 96 poços, não tratada (TPP). Foram adicionados 100 µL do inóculo por poço, exceto na coluna 12 (controle

negativo - meio de cultura), em seguida as placas foram seladas com parafilm e incubadas por 24 h, 37 °C.

Para as provas de análise do biofilme em formação, os óleos essenciais e as frações de *Mentha* spp. foram depositados nas placas antes do inóculo. Já nos testes de efetividade da droga contra o biofilme maduro foram adicionadas as frações e os óleos após incubação das placas com inóculo, por 24 h. Estas placas foram novamente incubadas, nas mesmas condições. Os compostos foram colocados na coluna 1 (8 mg/mL), seguido de microdiluição até a coluna 10. A coluna 11 foi usada como controle positivo (biofilme não exposto ao agente antifúngico) e a coluna 12 como controle negativo (meio de cultura).

4.10 Quantificação do biofilme com solução de XTT, de acordo com Pierce *et al.* (2008)

Após o tratamento antifúngico, o biofilme foi quantificado, bem como a atividade metabólica das cepas de *Candida*. Previamente, o biofilme foi lavado duas vezes com PBS e a cada poço foi acrescentado 80 µL de solução do corante XTT (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2*H*-tetrazolium-5-carboxanilida). A placa foi incubada por 2 h e em seguida foi feita a leitura no aparelho de ELISA a 490 nm.

Os valores de absorbância foram subtraídos dos valores de absorbância dos poços-controle de modo a avaliar a quantidade de biofilme formado.

4.11 Análise por Microscopias Óptica e Confocal a Laser

Microscopia Óptica

Após o tratamento com as respectivas drogas e compostos, além do grupo controle (biofilme com RPMI-1640), o biofilme realizado na placa de 96 poços foi lavado com PBS. Para microscopia óptica foi diretamente visualizado em microscópio de fase invertido (Westover Scientific, Mill Creek, WA), equipado com câmera fotográfica. As imagens foram processadas utilizando *software* Micron.

Microscopia Confocal a Laser

Após o tratamento com as respectivas drogas e compostos, além do grupo controle (biofilme com RPMI-1640), o biofilme realizado em placas de 24 poços foi lavado com PBS. Em seguida foi adicionado o corante FUN 1 (kit Molecular Probes, Eugene, Oreg.), componente indicador da viabilidade celular das leveduras, de acordo com as instruções do fabricante. As células vivas e mortas foram coradas com cor verde. No entanto, as metabolicamente ativas têm sua cor alterada para vermelho.

O biofilme foi observado em microscópio de laser confocal Olympus FV-500, por meio do protocolo de uso de isotiocianato rodamina-fluorescente, com elétrons a 488 nm (argon íon laser) e emissão de bandas de 505 a 525 nm (para verde) e > 560 nm (para vermelho). As imagens do eixo *XY* foram tomadas na axial *z* através do software. As imagens foram processadas e exibidas pelo Programa Adobe PhotoShop.

4.12 Análise dos óleos e frações de melhor atividade por CG-EM

A identificação dos constituintes dos óleos e frações que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana foi feita em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 Série II, equipado com detector seletivo de massas Hewlett-

Packard 5971, injetor *split/splitless*, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (25m x 0,2mm x 0,33µm). Temperaturas: injetor = 220°C, detector = 280°C, coluna = 60°C, 3°C.min⁻¹, 240°C (7 minutos). Vazão do gás de arraste (He super seco) = 1,0 mL.min⁻¹.

4.13 Avaliação da citotoxicidade em painel de linhagens celulares

As frações F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52 foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em painel de diferentes linhagens celulares utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SBR) para avaliação do crescimento celular (Monks *et al.*, 1991).

Além das células epiteliais renais normais (Vero), foram empregadas oito linhagens de células tumorais humanas (Tabela 2). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo NCI e são mantidas no laboratório de cultura de células da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas em frascos de 25 cm³ (Nunc[®]), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂.

Tabela 2: Linhagens celulares tumorais empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária
UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas	Endoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

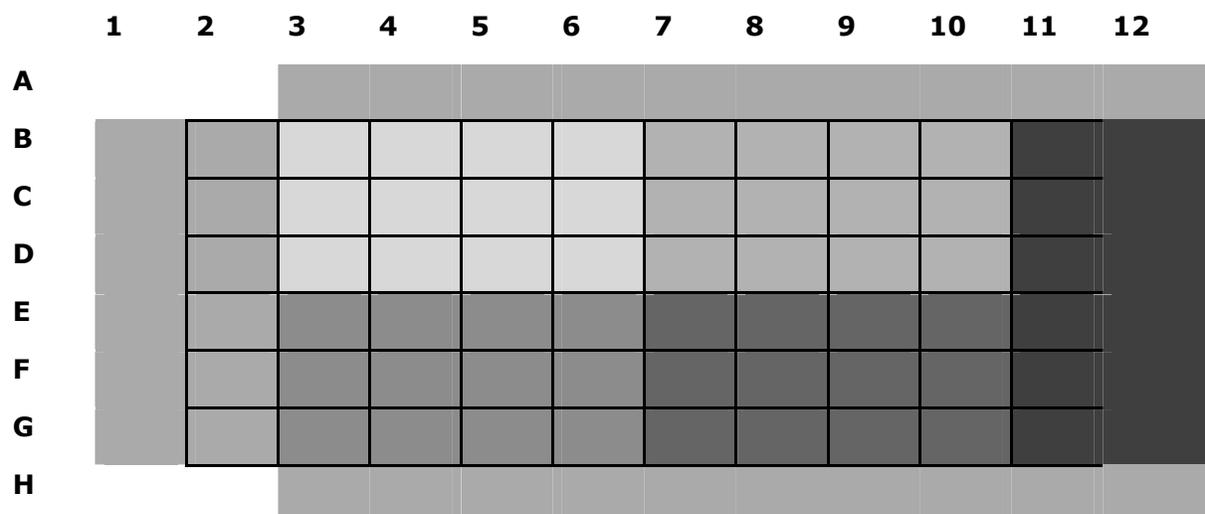
Foram inoculados 100 µL/poço, em placas de 96 poços (Nunc[®]), de uma suspensão com densidade de 3x10⁴ e 6,5x10⁴ cel/mL em meio RPMI/SFB

acrescido de 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plus[®]). Após 24h de incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂, foram adicionados 100 µL/poço das frações a serem testadas em 4 concentrações distintas (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) (Figura 1).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg de cada extrato foi dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foram dispersos em 950 µL de meio RPMI/5 % SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi então diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025 a 25 µg/mL. Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50 % da placa controle chamada T₀, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/poço de TCA a 50 % e as placas foram incubadas por 1 h a 4 °C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50 µL/poço de SRB 0,4 % (p/v), dissolvido em ácido acético 1 %, e mantidas por 60 min a 4 °C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1 % e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma[®]), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.



-  Branco do meio de cultura (sem células)
-  Branco da suspensão celular
-  Branco das amostras teste
-  Suspensão celular na presença da amostra 1 em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 2 em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 3 em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 4 em quatro concentrações distintas
-  Suspensão celular na presença da amostra 5 em quatro concentrações distintas

Figura 1: Esquema da aplicação das amostras, em 4 concentrações distintas, na placa teste (T1).

Com os valores médios de absorvância para cada concentração de cada amostra, a porcentagem de crescimento (% C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$

Onde:

T = média da absorvância da célula tratada – absorvância amostra sem célula

T_1 = absorvância do branco de células.

T_0 = absorvância do controle de células na placa T_0 .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra testada, para cada uma das linhagens testadas. A concentração efetiva denominada GI_{50} (do inglês *growth inhibition*, concentração necessária para interromper em 50 % o crescimento celular), foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoideal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

5 Resultados

5.1 Rendimentos em óleo essencial de *Mentha* spp.

Os melhores rendimentos em óleos essenciais (base seca) foram observados para os acessos de *M. spicata* (CM 31) (1,50 %) e *Mentha* sp. (CM 53) (1,45 %). Já o menor rendimento em óleo foi observado para *M. rotundifolia* (CM 35) procedente da Universidade de Brasília (0,030 %), e *M. piperita* L. (CM 69) da Universidade Federal de Ceará, com 0,038 % (Tabela 3).

Tabela 3. Acessos de *Mentha* spp. pertencentes à CPMA do CPQBA/UNICAMP utilizadas no presente estudo e dados referentes à extração de Óleos Essenciais (OE).

<i>Mentha</i> spp.	Origem	No. CPMA	Data da Coleta	Massa planta fresca (g)	Massa planta seca (g)	Teor de Umidade (%)	Rend. base planta fresca (%)	Rend. base planta seca (%)
<i>Mentha aquatica</i> L.	USA	CM 01	05/11/08	2,03	0,37	81,55	18,44	0,0733
<i>Mentha spp</i> <i>M villosa</i> Huds	USA	CM 02	05/07/07	2,25	0,26	88,50	11,50	0,2160
<i>Mentha x piperita</i> L.	USA	CM 03	14/11/08	1,17	0,12	88,99	11,00	0,0740
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh	USA	CM 04	06/11/08	2,00	0,22	88,98	11,01	0,7659
<i>Mentha canadensis</i> L.	USA	CM 05	14/11/08	1,07	0,28	73,05	26,94	0,8707
<i>Mentha piperita</i> L.	USA	CM 06	10/11/08	2,05	0,18	91,09	8,90	1,2320
<i>Mentha piperita</i> L.	USA	CM 08	18/07/07	2,46	0,26	89,43	10,56	0,5500
<i>Mentha piperita</i> L.	USA	CM 09	25/06/07	2,00	0,20	90,00	10,00	0,4364
<i>M. suaveolens x aquatica</i>	USA	CM 10	10/11/08	2,08	0,34	83,43	16,56	0,8523
<i>Mentha piperita</i> L.	USA	CM 11	10/11/08	2,01	0,21	83,43	10,87	0,8523
<i>Mentha aquatica</i> L.	USA	CM 13	04/11/08	2,09	0,13	93,36	6,63	0,0915
<i>Mentha piperita</i> L.	USA	CM 16	06/07/07	2,47	0,33	86,64	13,36	0,7250
<i>Mentha spicata</i>	USA	CM 17	15/07/07	1,46	0,19	86,99	13,01	0,2480
<i>Mentha aquatica</i> L.	USA	CM 18	06/11/08	2,03	0,37	81,55	18,44	0,0733
<i>Mentha aquatica</i> L.	USA	CM 19	24/09/07	3,39	0,34	89,97	10,02	0,8000
<i>Mentha canadenses</i>	USA	CM 20	05/07/07	2,86	0,51	82,16	17,83	1,0500
<i>Mentha x gracilis</i> Sole	USA	CM 22	10/06/08	1,25	0,21	83,20	16,80	0,1600
<i>Mentha x piperita</i> L	USA	CM 23	04/11/08	2,02	0,24	87,97	12,02	0,0532
<i>Mentha arvensis</i> L.	USA	CM 24	12/11/08	2,00	0,18	90,70	9,29	0,9562
<i>Mentha spicata</i> L.	USA	CM 25	12/11/08	2,00	0,21	89,21	10,78	0,1963
<i>Mentha arvensis</i> L.	USA	CM 26	03/11/08	2,02	1,09	45,94	54,05	0,1560
<i>Mentha longifolia</i>	USA	CM 27	06/07/07	2,15	0,39	81,86	18,14	0,2300
<i>Mentha spp</i> <i>M villosa</i> Huds	USA	CM 28	26/06/07	2,11	0,29	86,25	13,74	0,3950
<i>Mentha spicata</i> L.	DF	CM 29	03/11/08	2,06	0,17	91,65	8,34	0,3173
<i>Mentha spicata</i>	Uruguai	CM 30	03/11/08	2,03	0,31	84,38	15,61	0,2070
<i>Mentha spicata</i> L.	UnB	CM 31	10/11/08	2,05	0,31	84,75	15,25	1,5000
<i>Mentha piperita</i> L.	UnB	CM 32	06/11/08	2,00	0,32	82,25	17,75	0,0548
<i>Mentha spicata</i> L.	UnB	CM 33	10/06/08	1,17	0,24	79,49	20,51	0,3100
<i>Mentha sylvestris</i>	UnB	CM 34	14/06/08	1,42	0,21	85,32	14,68	0,2700
<i>Mentha rotundifolia</i> L.	UnB	CM 35	05/11/08	2,02	0,17	91,44	8,55	0,0306
<i>Mentha arvensis</i> L.	UnB	CM 36	17/10/07	2,90	0,40	86,21	13,79	0,5400
<i>Mentha campestris</i> Shur	UnB	CM 37	16/10/07	2,87	0,37	87,11	12,89	1,3200
<i>Mentha sp. M villosa</i> Huds	UnB	CM 38	27/06/07	2,10	0,25	88,90	11,90	0,2780

<i>Mentha</i> spp.	Origem	No. CPMA	Data da Coleta	Massa planta fresca (g)	Massa planta seca (g)	Teor de Umidade (%)	Rend. base planta fresca (%)	Rend. base planta seca (%)
<i>Mentha piperita</i> L.	UnB	CM 39	25/09/07	2,08	0,25	87,98	12,01	0,8500
<i>Mentha longifolia</i> L. Huds	UnB	CM 40	10/06/08	2,21	0,42	81,08	18,92	0,1358
<i>Mentha spicata</i> L.	CPQBA	CM 41	25/09/07	1,79	0,19	89,39	10,61	0,7600
<i>Mentha piperita</i> L.	CPQBA	CM 43	10/06/08	2,36	0,34	85,23	14,77	0,0700
<i>Mentha piperita</i> /Citrata	CPQBA	CM 44	16/10/07	2,04	0,32	84,32	15,68	0,3600
<i>Mentha suaveolens</i>	CPQBA	CM 45	01/12/08	2,09	0,15	92,47	7,52	0,2750
<i>Mentha arvensis</i> L.	CPQBA	CM 46	15/10/07	3,12	0,66	78,85	21,15	1,0180
<i>Mentha</i> sp.	SP	CM 47	17/11/08	2,01	0,48	75,89	24,10	0,0652
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 49	05/11/08	2,02	0,27	86,61	13,38	0,1656
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 50	01/12/08	1,72	0,18	89,24	10,75	0,4107
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 51	25/06/07	2,07	0,25	87,92	12,07	0,0931
<i>Mentha suaveolens</i> x <i>spica</i> .	IAC	CM 52	05/11/08	2,01	0,40	80,11	19,88	0,2069
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 53	10/11/08	2,01	0,20	89,75	10,24	1,4521
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 54	01/12/08	2,06	0,17	91,75	8,24	0,3450
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 55	01/12/08	1,35	0,11	91,43	8,56	0,5500
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 56	29/10/07	3,68	0,43	88,31	11,68	0,1020
<i>Mentha</i> sp.	IAC	CM 57	10/06/08	1,99	0,27	86,43	13,57	0,0700
<i>Mentha</i> sp.	SC	CM 58	01/12/08	1,07	0,10	89,98	10,01	0,1550
<i>Mentha arvensis</i> L.	Paraná	CM 59	02/07/07	1,89	0,39	79,36	20,63	0,3940
<i>Mentha aquatica</i> L.	KG	CM 60	12/11/08	2,00	0,28	85,74	14,25	1,3070
<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh	KG	CM 61	17/07/07	2,62	0,32	87,78	12,21	0,1250
<i>Mentha</i> sp.	Paraná	CM 62	14/06/08	1,37	0,15	89,13	10,87	0,8560
<i>Mentha</i> sp.	Unesp	CM 63	18/07/07	2,17	0,25	88,48	11,52	0,0966
<i>Mentha</i> sp.	Unesp	CM 64	01/12/08	2,09	0,17	91,61	8,38	0,4710
<i>Mentha</i> sp <i>M villosa</i> Huds	UFC	CM 65	03/11/08	2,01	0,24	87,71	12,28	0,0653
<i>Mentha arvensis</i> L.	UFC	CM 66	17/11/08	2,07	0,26	87,24	12,75	0,1708
<i>Mentha piperita</i> /Citrata Ehl	UFC	CM 67	29/10/07	4,00	0,46	88,50	11,5	0,7450
<i>Mentha rotundifolia</i> Huds	UFC	CM 68	24/09/07	3,72	0,37	90,05	9,94	0,3600
<i>Mentha piperita</i> L.	UFC	CM 69	06/11/08	2,00	0,20	89,66	10,34	0,0382
<i>Mentha</i> sp.	MG	CM 70	15/10/07	2,65	0,30	88,68	11,32	0,1200
<i>Mentha</i> sp.	MG	CM 72	17/10/07	2,70	0,35	87,04	12,96	0,1400

CM = número na CPMA; IAC = Instituto Agrônomo de Campinas; UnB = Universidade de Brasília; CPQBA = Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas/UNICAMP; UFC = Universidade Federal do Ceará; UNESP = Universidade Estadual de São Paulo; MG = Minas Gerais; DF = Distrito Federal; SC = Sementes Comerciais; KG = Kew Garden, Inglaterra; SP = São Paulo.

5.2 Atividade antimicrobiana de acessos de *Mentha* spp. frente às células planctônicas de *Candida* spp.

A maioria dos óleos essenciais de *Mentha* spp. testados apresentaram valores de CIM(s) maiores ou iguais a 1 mg/mL. Os resultados estão ilustrados na tabela 10 (Anexo VI).

Atividades de até 1 mg/mL foram detectadas para vários dos acessos estudados, porém destacamos os que mostraram inibição até 0,5 mg/mL:

M. aquatica L. (CM 19) para o isolado clínico 13 A5 (0,1875 mg/mL) e CBS 7987 (0,312 mg/mL), assim como *Mentha X piperita* (CM 23) para 13 A5 (0,500 mg/mL) e CBS 7987 (0,500 mg/mL);

Mentha spp *M villosa* Huds (CM 38) (0,500 mg/mL), *M. campestris* Shur (CM 37) (0,1875 mg/mL) e *M. spicata* L. (CM 33) (0,1875 mg/mL) e *M. silvestris* L. (CM 34) (0,125 mg/mL) para o isolado clínico 26 A4;

M. spicata (CM 17) para todas as cepas de *C. dubliniensis* com valores de CIM entre 0,1875 mg/mL e 0,500 mg/mL;

Mentha sp. (CM 72) (0,015 mg/mL), *Mentha* sp. (CM 70) (0,007 mg/mL), *M. longifolia* (CM 27) (0,046 mg/mL), *M. arvensis* L. (CM 59) (0,125 mg/mL), *Mentha* sp. (CM 56) (0,125 mg/mL) e *Mentha* sp. (CM 51) (0,125 mg/mL) apenas para o isolado clínico 3 A5.

Mentha sp. (CM 64) para as cepas 13 A5 (0,031 mg/mL), 47 A5 (0,125 mg/mL), CBS 562 (0,046 mg/mL), 26 A3 (<0,007 mg/mL), 26 A2 (0,125 mg/mL), CBS 7987 (0,125 mg/mL).

M. arvensis L. (CM 36) para as cepas CBS 562 (0,250 mg/mL), 13A5 (< 0,007 mg/mL) e todas as cepas de *C. dubliniensis* (entre 0,125 mg/mL e 0,312 mg/mL).

Além deste último, mais 3 acessos se destacaram, inibindo todas as cepas testadas, sendo esses, *M. canadensis* (CM 05) - *C. dubliniensis* (<0,007 até 0,187 mg/mL); e *C. albicans* (<0,007 até 0,125 mg/mL); *Mentha spicata* (CM 30) - *C. dubliniensis* (0,062 mg/mL até 0,125 mg/mL); *C. albicans* (0,500 mg/mL) e *Mentha suaveolens x spicata* (CM 52) - *C. dubliniensis* (0,062 mg/mL até 0,125 mg/mL); *C. albicans* (0,250 mg/mL até 0,500 mg/mL).

Os óleos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana, os quais foram *M. canadensis* CM 05, *Mentha suaveolens x spicata* CM 52, *Mentha spicata* CM 30, e *M. arvensis* CM 36, foram selecionados para testes em biofilmes de *C. albicans*.

O antifúngico controle utilizado foi o poliênico Nistatina (Merck®), cujos resultados estão ilustrados na tabela 11 (Anexo VII).

5.3 Fracionamento dos óleos essenciais de melhor atividade em coluna seca

Os resultados das análises realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) dos óleos essenciais de melhor atividade e suas respectivas frações estão apresentados na Figura 2. As frações foram agrupadas segundo a equivalência das bandas obtidas na CCD, totalizando 5 diferentes frações (F1 a F5) para os óleos essenciais de melhor atividade.

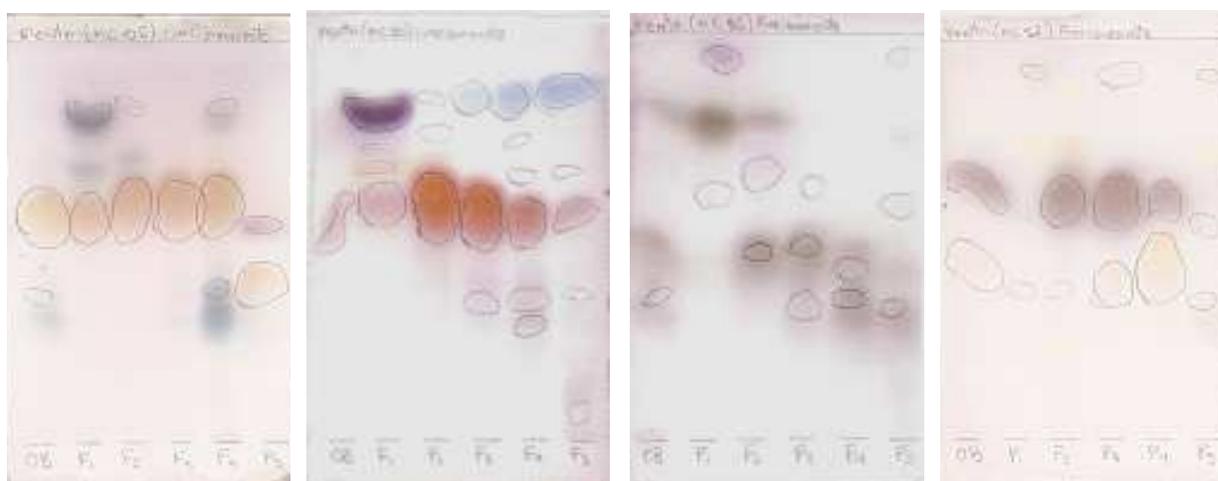


Figura 2: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos óleos essenciais de *M. canadensis* (CM 05), *M. spicata* (CM 30), *M. arvensis* (CM 36) e *M. suaveolens x spicata* (CM 52). OB= óleo bruto; F= Fração.

A Tabela 4 apresenta os resultados de rendimento (% base seca) em frações obtidas a partir dos acessos de *Mentha* spp. Os resultados mostraram rendimentos acima de 90 % para a maioria dos óleos, sendo que o óleo proveniente do acesso CM 30 foram obtidos rendimentos em frações menores do que 50 % (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimento (% base seca) de frações obtidas a partir dos óleos dos acessos de *Mentha* spp.

Acesso de <i>Mentha</i> spp	Fração (F)	Massa da fração (g)	Rendimento da fração (%)
CM 05 <i>M. canadensis</i>	F1	0,0699	7,67
	F2	0,4454	48,87
	F3	0,2599	28,52
	F4	0,1109	12,17
	F5	0,0252	2,77
Rendimento total (%)		0,9113	100,00
CM 30 <i>M. spicata</i>	F1	0,0128	4,61
	F2	0,0232	8,35
	F3	0,0203	7,31
	F4	0,0470	16,92
	F5	0,0156	5,62
Rendimento total (%)		0,1189	42,82
CM 36 <i>M. arvensis</i>	F1	0,0772	6,36
	F2	0,3533	29,13
	F3	0,3279	27,03
	F4	0,248	20,45
	F5	0,0994	8,20
Rendimento total (%)		1,1058	91,17
CM 52 <i>M. suaveolensx spicata</i>	F1	0,0158	4,12
	F2	0,0650	16,95
	F3	0,1173	30,59
	F4	0,1260	32,86
	F5	0,0362	9,44
Rendimento total (%)		0,3603	93,96

5.4 Ação dos óleos essenciais, das frações de *Mentha* spp. e de antifúngicos comerciais sobre o biofilme de *C. albicans* SC 5314.

Os resultados obtidos para a ação dos óleos brutos e frações de *Mentha* spp. estão ilustrados nas Figuras 3 a 26. Os resultados dos antifúngicos comerciais encontram-se nas figuras 27 e 28.

5.4.1 Ação dos óleos essenciais de *Mentha* spp. sobre o biofilme de *C. albicans* SC 5314

Os óleos essenciais brutos apresentaram inibição < 50% tanto no biofilme em formação, como sobre o biofilme maduro de *C. albicans*.

As figuras de 3 a 6 ilustram os gráficos referentes aos resultados expressos em valores percentuais, tendo como referência o biofilme controle (valor=0), sem óleo essencial. **A.** Biofilme formado na presença do óleo essencial. **B.** Biofilme pré-formado 24 h da adição do óleo essencial.

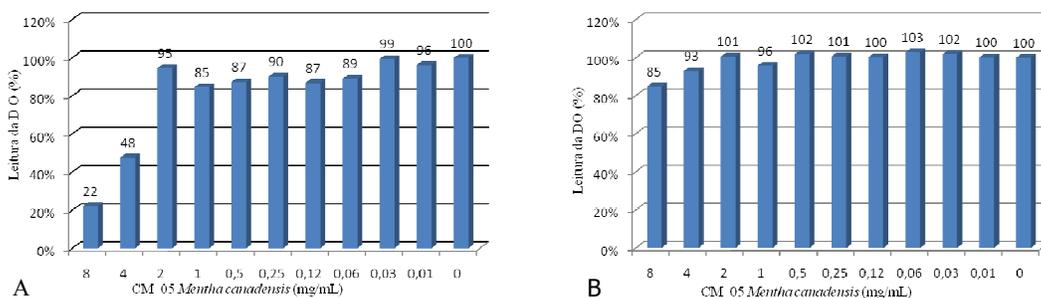


Figura 3. Efeito do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

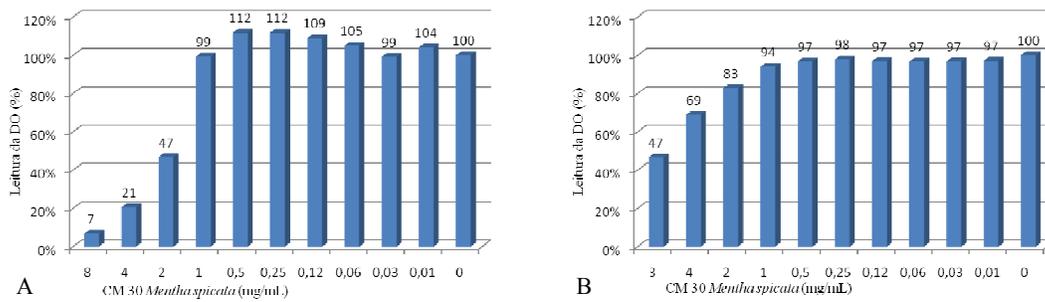


Figura 4. Efeito do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

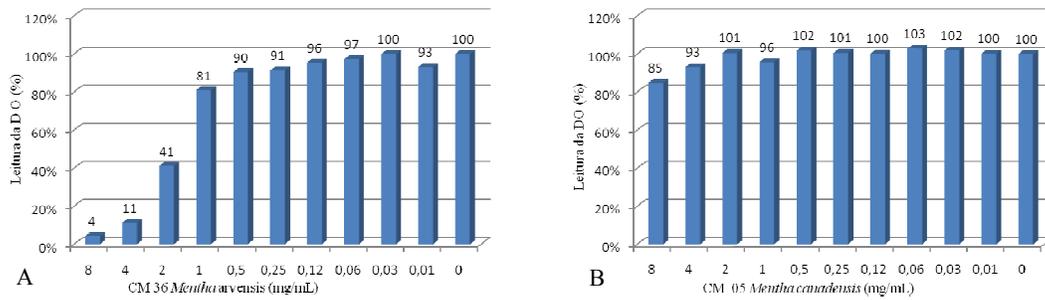


Figura 5. Efeito do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

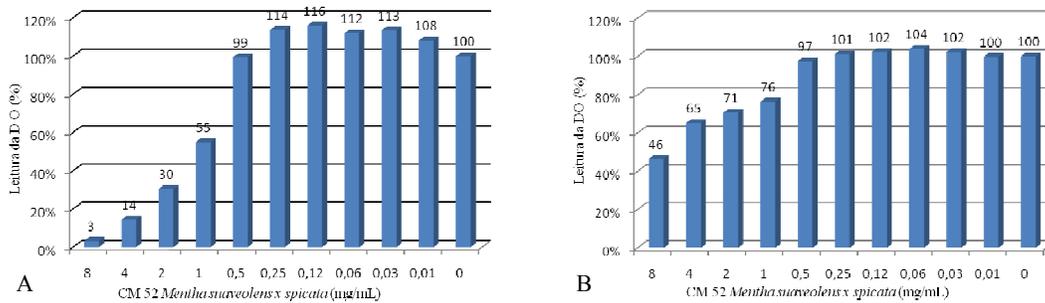


Figura 6. Efeito do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

5.4.2 Ação das frações de *Mentha* spp. sobre o biofilme de *C. albicans* SC 5314

Embora os óleos não tenham apresentado eficácia sobre biofilme, algumas frações demonstraram forte atividade. As frações F2 e F3 de *M. suaveolens x*

spicata CM 52 demonstraram a melhor atividade dentre as frações testadas, apresentando 49 % e 38 % de inibição na concentração de 0,5 mg/mL para biofilme maduro e 70 % de inibição (a 0,062 mg/mL) e 61 % de inibição (a 0,125 mg/mL), respectivamente, para inibição de biofilme em formação (Figuras 23 e 24).

Outras frações também apresentaram efetividade para inibir a formação de biofilme: as frações F2, F3 e F4 do acesso CM 30 inibiram 66 %, 76 % e 70 %, respectivamente, a 0,5 mg/mL, enquanto a F5 inibiu 70 % a 0,25 mg/mL (Figuras 13 a 16); as frações F1, F2, F3 e F4 do acesso CM 36 inibiram 61 %, 85 %, 71 % e 47 % a 0,5 mg/mL, respectivamente (Figuras 17 a 20). Ainda F4 de CM 52 que inibiu 66% a 0,5 mg/mL (Figura 25).

As figuras de 7 a 26 ilustram os gráficos referentes aos resultados expressos em valores percentuais, tendo como referência o biofilme controle (valor=0), sem fração. **A.** Biofilme formado na presença das frações. **B.** Biofilme pré-formado 24 h da adição das frações.

Ação das frações de *M. canadensis* CM 05 sobre o biofilme de *C. albicans* SC5314

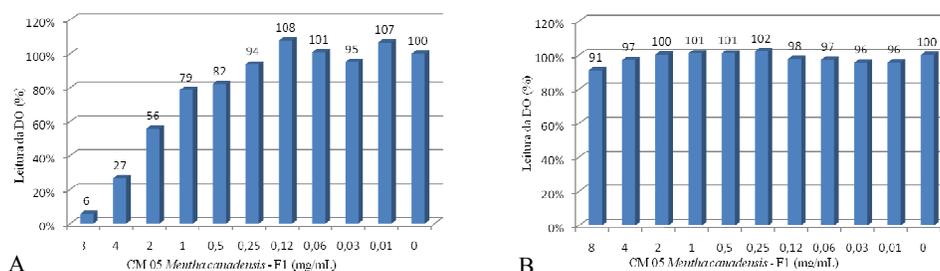


Figura 7. Efeito da fração F1 do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

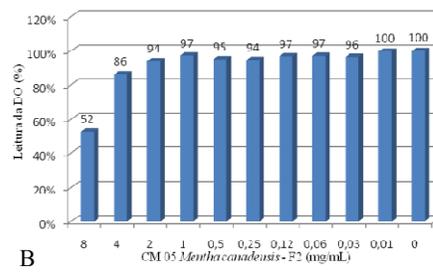
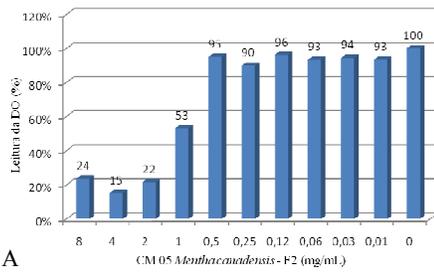


Figura 8. Efeito da fração F2 do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

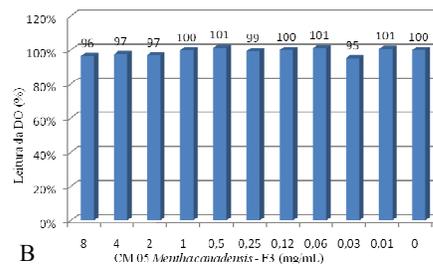
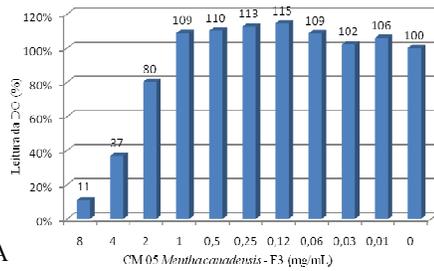


Figura 9. Efeito da fração F3 do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

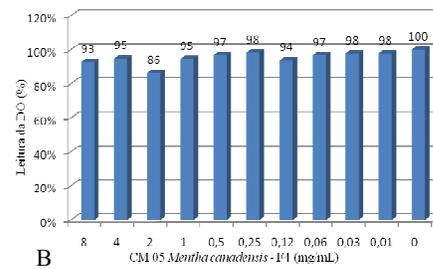
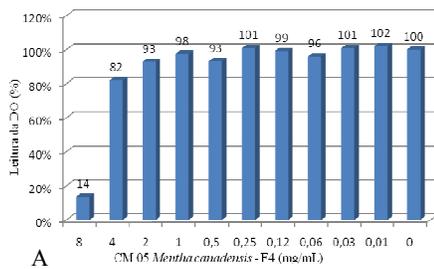


Figura 10. Efeito da fração F4 do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

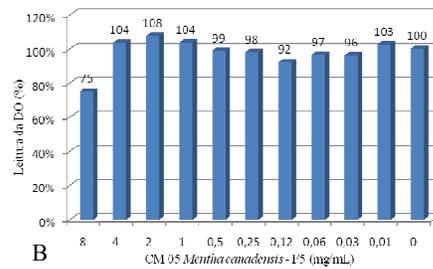
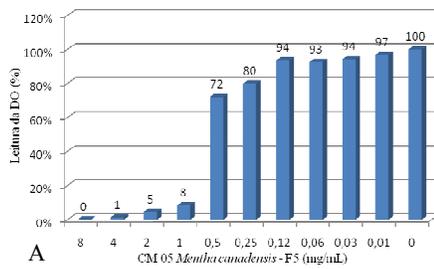


Figura 11. Efeito da fração F5 do óleo essencial de *M. canadensis* (CM 05) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

Ação das frações de *M. spicata* CM 30 sobre o biofilme de *C. albicans* SC5314

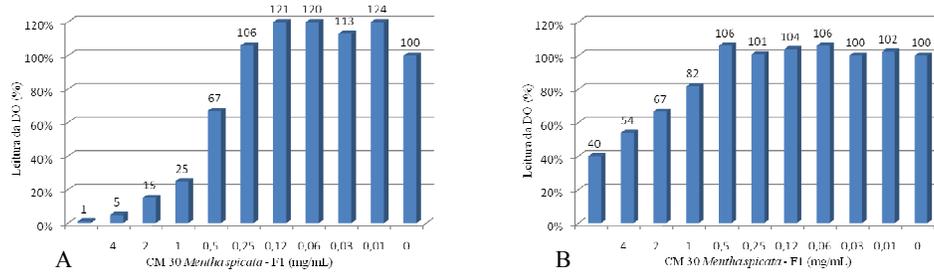


Figura 12. Efeito da fração F1 do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

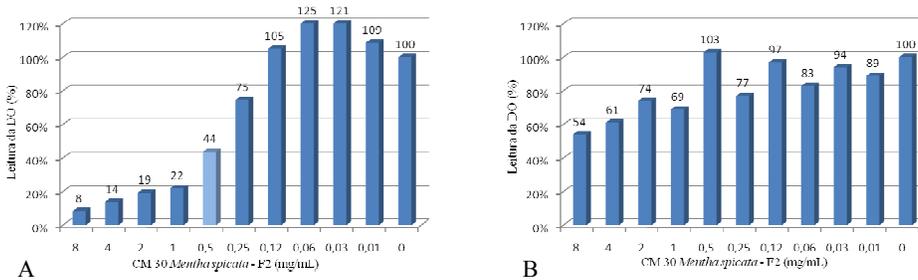


Figura 13. Efeito da fração F2 do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

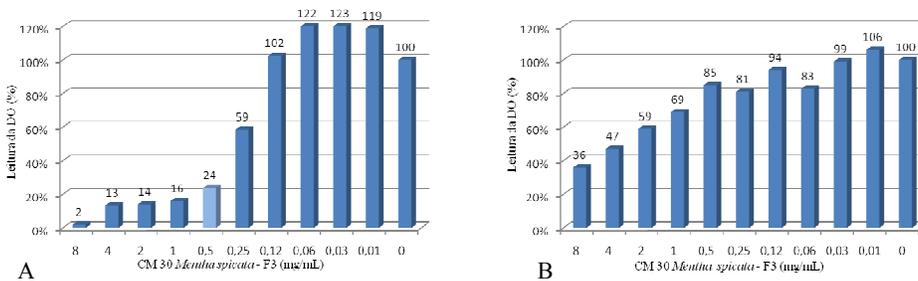


Figura 14. Efeito da fração F3 do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

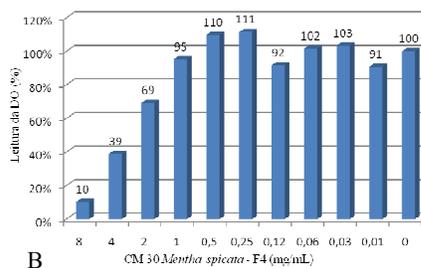
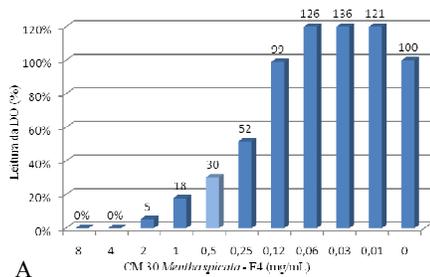


Figura 15. Efeito da fração F4 do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

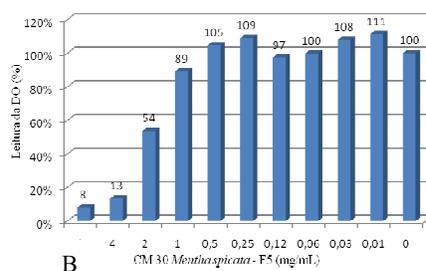
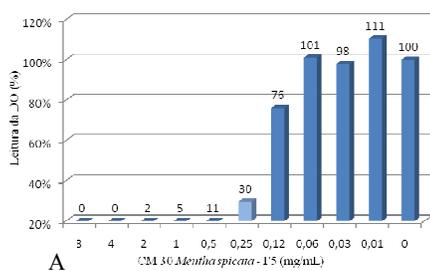


Figura 16. Efeito da fração F5 do óleo essencial de *M. spicata* (CM 30) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

Ação das frações de *M. arvensis* CM 36 sobre o biofilme de *C. albicans* SC5314

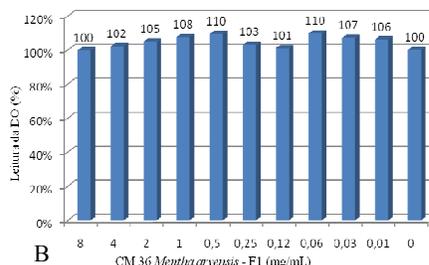
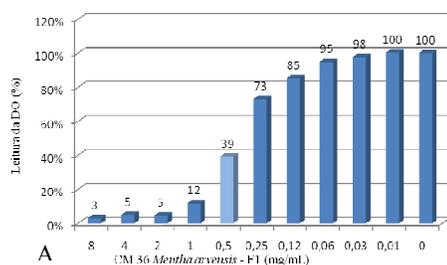


Figura 17. Efeito da fração F1 do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

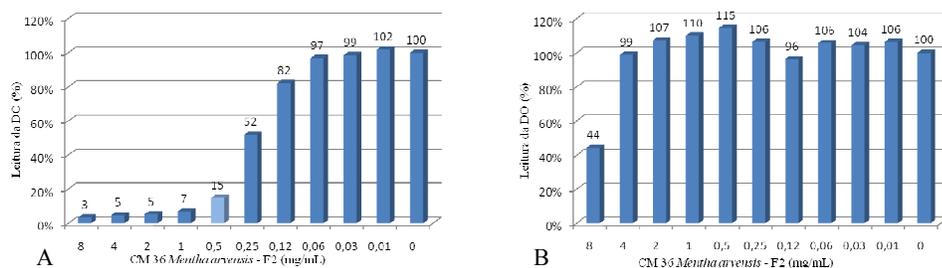


Figura 18. Efeito da fração F2 do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

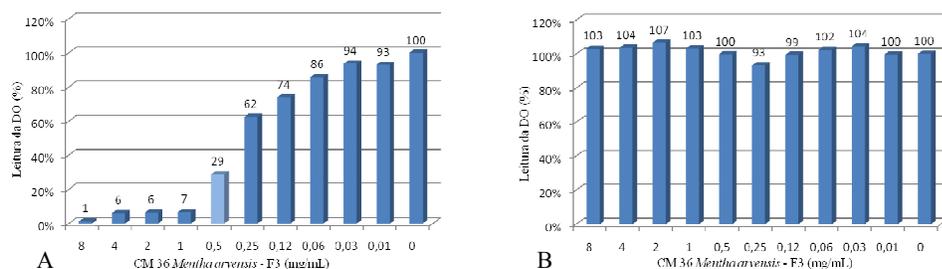


Figura 19. Efeito da fração F3 do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

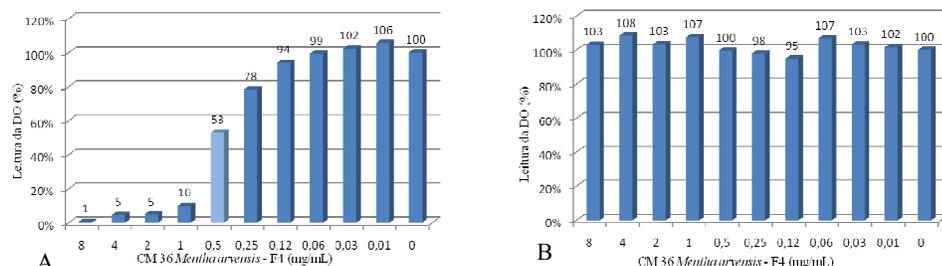


Figura 20. Efeito da fração F4 do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

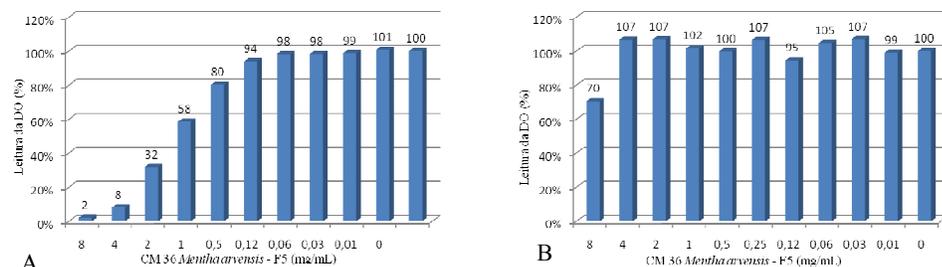


Figura 21. Efeito da fração F5 do óleo essencial de *M. arvensis* (CM 36) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

Ação das frações de *M. suaveolens x spicata* CM 52 sobre o biofilme de *C. albicans* SC5314

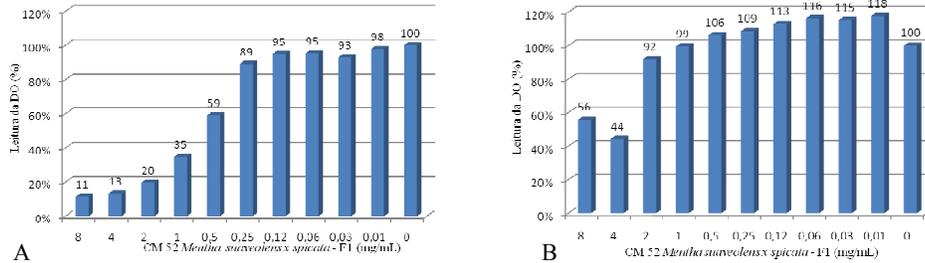


Figura 22. Efeito da fração F1 do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

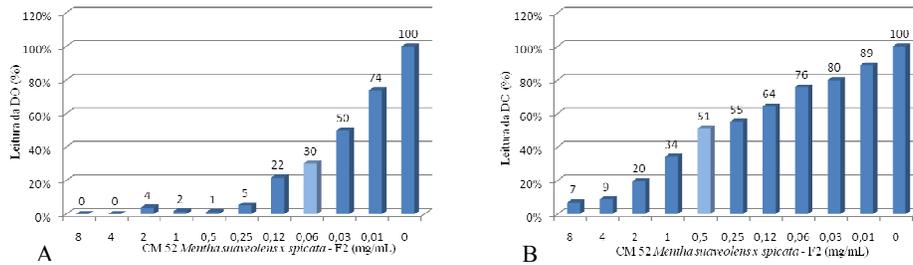


Figura 23. Efeito da fração F2 do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

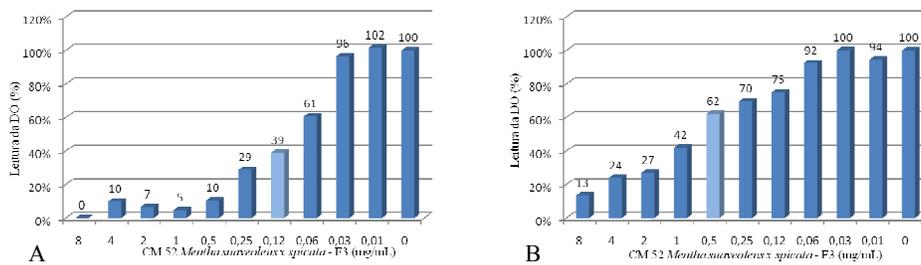


Figura 24. Efeito da fração F3 do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

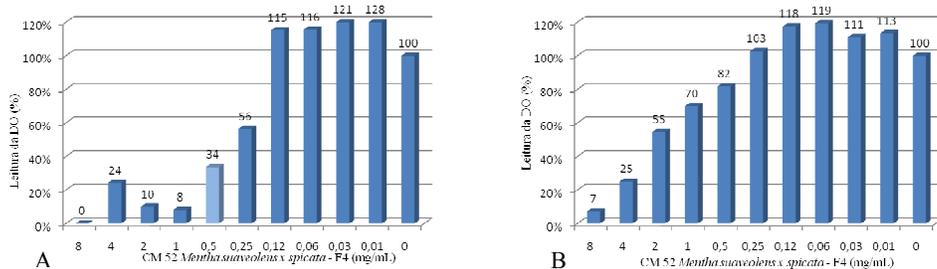


Figura 25. Efeito da fração F4 do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

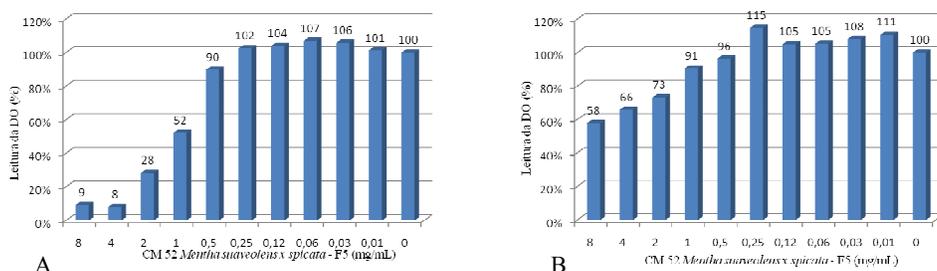


Figura 26. Efeito da fração F5 do óleo essencial de *M. suaveolens x spicata* (CM 52) sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

5.4.3 Ação de antifúngicos comerciais sobre o biofilme de *C. albicans* SC5314

Os testes foram realizados com duas classes de antifúngicos comerciais, que foram o poliênico Anfotericina B (Sigma®) e Fluconazol (Sigma®).

Os resultados mostraram que o biofilme maduro de *C. albicans* apresentou resistência ao Fluconazol, com inibição menor que 30 % aproximadamente para todas as concentrações testadas. Ainda esse antifúngico não inibiu o biofilme em formação, apresentando entre 30 e 36 % de densidade óptica em todas as concentrações, ou seja, com inibição entre 70 % e 64 %, para todas as concentrações provadas.

Quanto a Anfotericina B, os resultados mostraram que essa droga inibiu o biofilme nas concentrações entre 1 e 16 µg/mL. O antifúngico inibiu o biofilme

maduro em 64 %, a 1 µg/mL e inibiu o biofilme em formação em 75 % na mesma concentração.

As figuras de 27 a 28 ilustram os gráficos referentes aos resultados expressos em valores percentuais, tendo como referência o biofilme controle (valor=0), sem droga. **A.** Biofilme formado na presença do antifúngico. **B.** Biofilme pré-formado 24 h da adição do antifúngico.

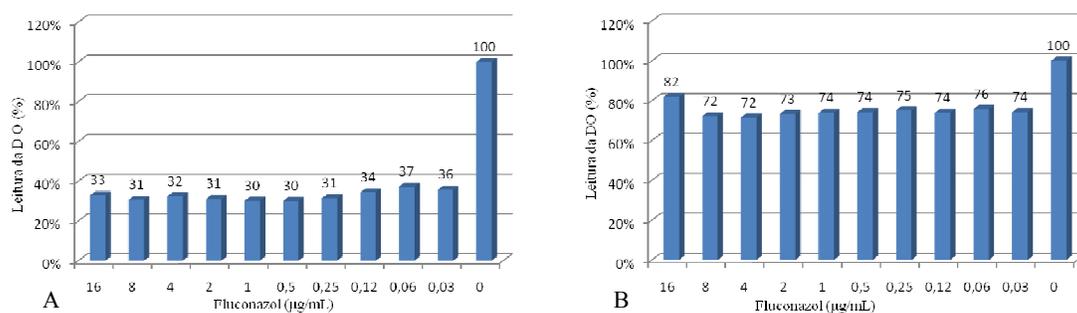


Figura 27. Efeito do antifúngico Fluconazol sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

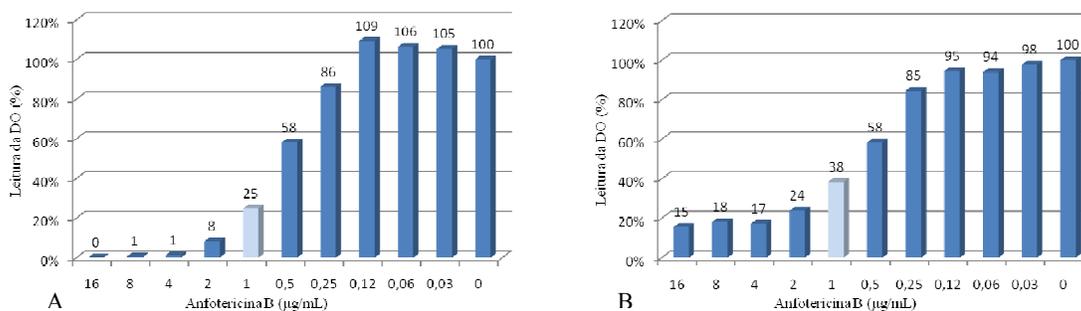


Figura 28. Efeito do antifúngico Anfotericina B sobre biofilme de *C. albicans* SC5314.

5.6 Análise dos efeitos das frações F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52 sobre o biofilme de *C. albicans* SC 5314 por Microscopias Óptica e Confocal a Laser

Foi realizada a visualização do efeito das frações de melhor atividade antimicrobiana, F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52 sobre o biofilme de *C.*

albicans SC 5314, por meio de duas técnicas diferentes de microscopia: microscopia óptica e microscopia confocal a laser. Para essas técnicas os biofilmes foram desenvolvidos no mesmo período de tempo, crescidos durante 24 horas. Ainda na microscopia óptica também foi avaliado o biofilme em formação.

Essas técnicas atuaram no presente estudo como uma ferramenta auxiliar qualitativa, por meio das ilustrações das leveduras após tratamento, além de ser também quantitativa, confirmando resultados das medidas de absorvância no leitor de microplacas de ELISA (Figura 29).

Através da microscopia óptica, foi observada a morfologia celular do biofilme maduro e em formação, na presença das frações. Os resultados foram comparados com os controles, ou seja, biofilme crescido sem a presença de drogas. Os efeitos das frações de melhor atividade antimicrobiana sobre o biofilme formado por *C. albicans* SC5314 foram confirmados pela microscopia óptica, conforme ilustrado na Figura 29.

Os resultados revelaram que o biofilme formado na presença da fração F2 era composto por hifas na sua maior parte. Já na fração F3, o biofilme possuía hifas predominantes, com a presença de diversas pseudo-hifas e algumas leveduras. Quando colocadas em biofilmes maduros, as frações apresentaram menor inibição. Logo, o biofilme mostrou maior densidade celular, quando comparado ao biofilme em formação. As frações entre si mostraram maior densidade celular na presença da F3 (Figura 29), tanto para biofilme em formação, quanto no biofilme maduro.

Os resultados do biofilme na presença das frações apresentaram menor densidade celular, quando comparados ao controle.



Figura 29. Análise microscópica do efeito das frações de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 sobre biofilme de *C. albicans* SC5314, na concentração de 0,5mg/mL. **A.** Biofilme formado na presença da fração F2. **B.** Biofilme formado na presença da fração F3. **C.** Controle do biofilme em formação - 24h (sem fração). **D.** Controle do biofilme maduro – 48 h (sem fração). **E.** Biofilme maduro submetido à adição da fração F2 por 24h. **F.** Biofilme maduro submetido à adição da fração F3 por 24 h.

Por meio da microscopia confocal a laser, foi avaliada a heterogeneidade do biofilme, sua espessura, variabilidade topográfica, além de comprovar sua complexa arquitetura tridimensional. Os resultados estão apresentados na Figura 30.

Os resultados demonstraram que o biofilme controle (sem frações) apresentou uma arquitetura mais complexa do que os biofilmes testados, com espessura de 846 μm . A fração F2 obteve inibição de 57 %, enquanto F3 obteve de 61 %, demonstrando uma arquitetura menos complexa, devido a sua menor espessura, comparadas ao controle.

Os efeitos das frações de melhor atividade antimicrobiana sobre o biofilme formado por *C. albicans* SC5314 foram também confirmados pela microscopia confocal a laser (Figura 29).

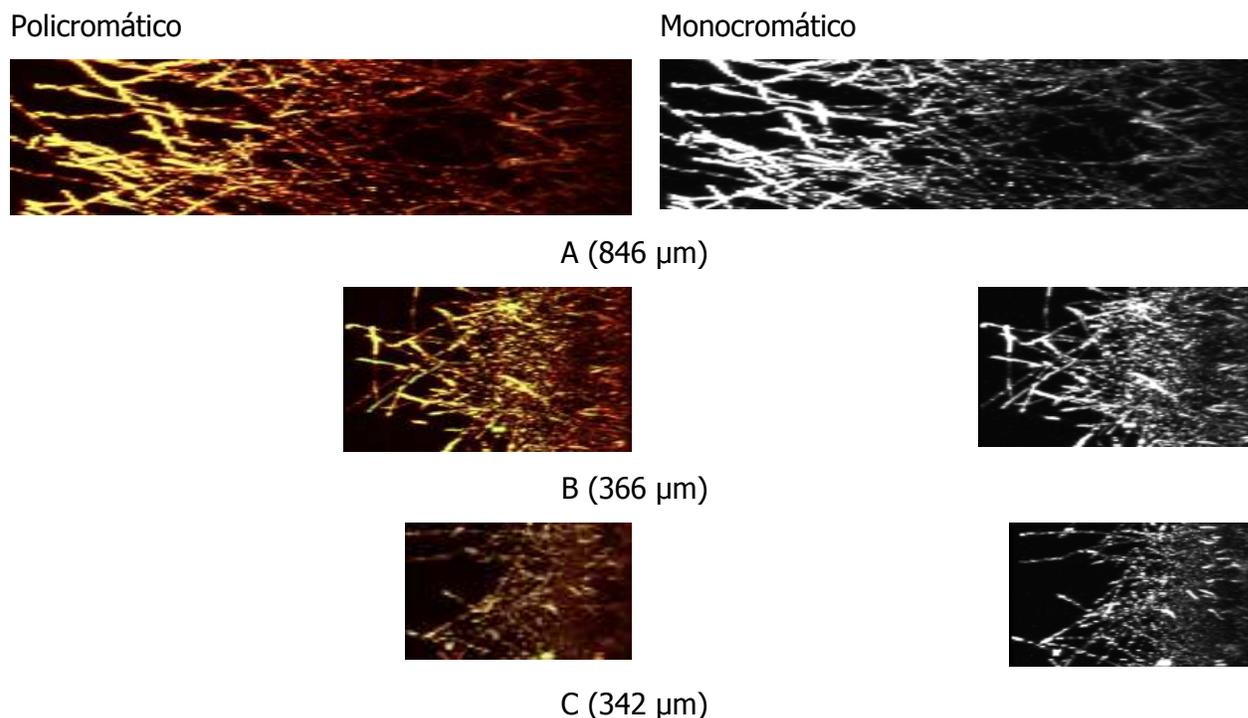
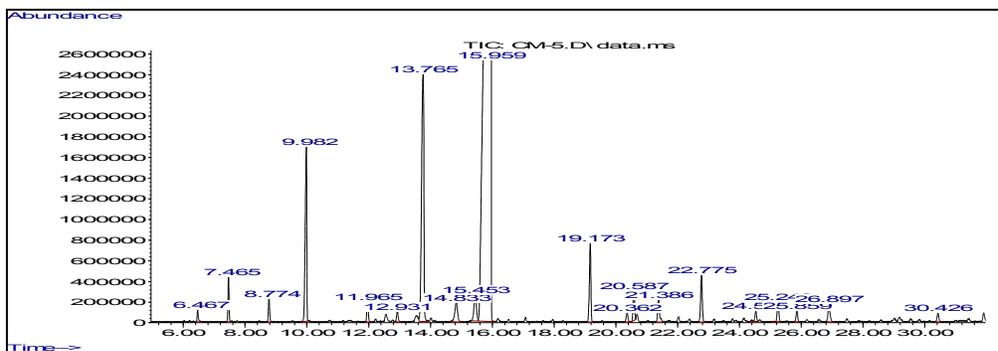


Figura 30. Análise microscópica policromática e monocromática do biofilme maduro de *C. albicans* SC5314, mostrando o efeito das frações da *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 na concentração de 0,5mg/mL. **A.** Controle do biofilme (sem fração). **B.** Biofilme formado na presença da fração F2 (57% de inibição). **C.** Biofilme formado na presença da fração F3 (61% de inibição).

5.7 Análise da composição química dos óleos essenciais de melhor atividade por Cromatografia a Gás com espectrometria de Massas (CG-EM)

A composição química dos óleos essenciais encontra-se apresentada nas Figuras 31 a 34 e nas Tabelas 5 a 8. A avaliação foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM). Os constituintes mais relevantes foram identificados por comparação dos espectros de massas com os da Biblioteca NIST, bem como por comparação dos dados de Índices de Retenção e espectros de massas, descritos na literatura (Adams *et al.*, 1995; Pino *et al.*, 2001), obtidos em condições cromatográficas similares.

De acordo com os resultados, as espécies de *Mentha* de melhor atividade apresentaram diferentes composições químicas. Os compostos majoritários do óleo de *M. canadensis* CM 05 foram carvona (74,84 %), linalol (4,84 %) e acetato de dihidro carveol (2,04 %). Já os compostos majoritários de *M. spicata* CM 30 foram óxido de piperitenona (28,05 %), beta-E-farneseno (18,58 %) e gama-muuroleno (17,38 %). Linalol (33,24 %), acetato de linalol (21,97 %) e alfa-terpineol (11,77 %) foram identificados como compostos majoritários em *M. arvensis* CM 36, enquanto a pulegona (52,20 %) a piperitenona (29,51 %) e o gama-muuroleno (4,44 %) foram identificados no óleo de *M. suaveolens x spicata* CM 52. Vários dos compostos identificados nas *Menthas* spp., como linalol, gama-muuroleno e alfa-terpineol foram anteriormente relacionados com atividade antimicrobiana.



- Figura 31 Cromatograma expandido (5-32 min) da amostra CM-05

Tabela 5 – Identificação dos analitos da amostra CM-05

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
6,47	997	3-octanol	0,24
7,47	1027	limoneno	0,82
8,78	1066	hidrato de cis-sabineno	0,51
9,98	1102	linalol	4,34
11,96	1152	mentona	0,48
12,93	1177	terpin-4-ol	0,29
13,77	1198	trans-dihidro-carvona	9,45
14,83	1224	cis-carveol	0,89
15,45	1239	M = 152	1,05
15,96	1251	carvona	74,84
19,17	1328	acetato de dihidro carveol	2,04
20,36	1357	eugenol	0,26
20,59	1362	acetato de cis carveila	0,73
21,38	1382	beta-bourboneno	0,69
22,78	1416	trans-cariofileno	1,31
24,53	1459	cis-muuro-la-4(14),5-dieno	0,33
25,25	1477	gama-muuroleno	0,57
25,86	1492	biclogermacreno	0,32
26,90	1519	cis-calameneno	0,58
30,43	1612	<1,10-DI-EPI->cubenol	0,27
Total			100,01

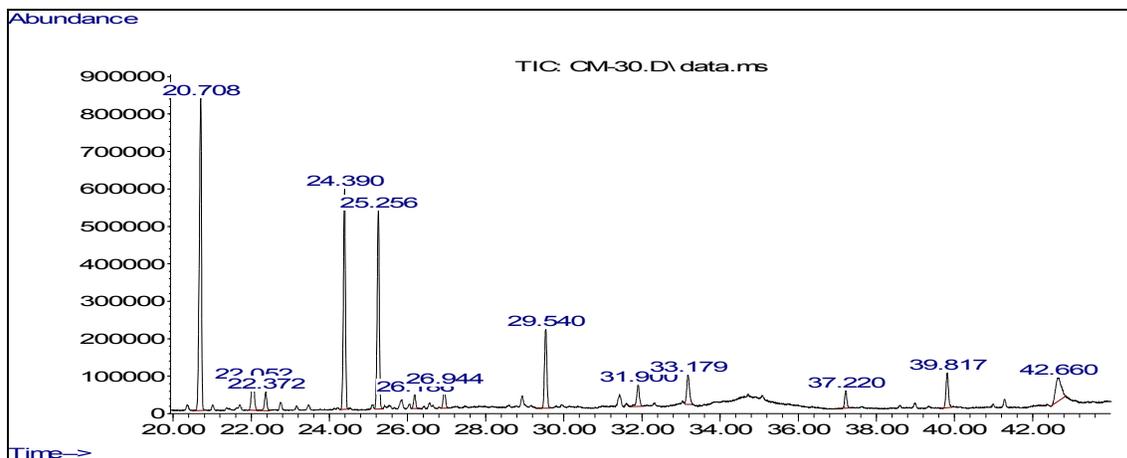


Figura 32 - Cromatograma expandido (20-44 min) da amostra CM-30

Tabela 6 – Identificação dos analitos da amostra CM-30

t _R (min)	IR	Identificação	% rel.
20,71	1365	óxido de piperitenona	28,05
22,05	1398	M = 166	3,59
22,37	1406	alfa-gurjuneno	1,67
24,39	1456	beta-E-farneseno	18,58
25,26	1477	gama-muuroleno	17,38
26,19	1501	n.i.	1,30
26,94	1520	delta-cadineno	1,92
29,54	1588	globulol	7,62
31,90	1652	alfa-cadinol	2,42
33,18	1687	n.i.	5,07
37,22	1802	2-etilhexil-salicilato	1,65
39,82	1881	homo-mentil-salicilato	3,39
42,66	1969	n.i.	7,35
Total			86,09

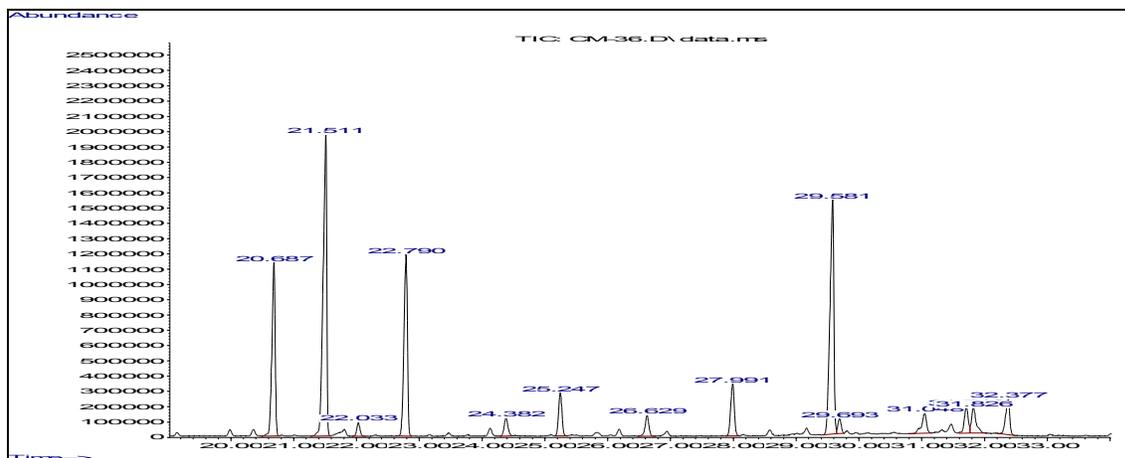


Figura 33 - Cromatograma expandido (19-34 min) da amostra CM-36

Tabela 7 – Identificação dos analitos da amostra CM-36

t_R (min)	IR	Identificação	% rel.
3,22	-----	n.i.	0,27
6,02	978	1-octen-3-ol	0,38
8,09	1046	beta-ocimeno	0,29
10,10	1105	linalol	33,24
10,39	1112	n.i.	0,28
12,76	1172	cis-pinocanfona	0,37
13,57	1193	alfa-terpineol	11,77
13,73	1197	trans-dihidro-carvona	0,35
15,06	1229	nerol (ou cis-geraniol)	1,88
15,65	1243	carvona	2,76
16,25	1258	acetato de linalol	21,97
20,69	1365	acetato de nerila	3,54
21,51	1385	acetato de geranila	6,87
22,03	1397	cis-jasmona	0,26
22,79	1416	trans-cariofileno	3,88
24,38	1456	beta-E-farneseno	0,42
25,25	1477	gama-muuroleno	0,90
26,63	1512	M = 222	0,49
27,99	1548	elemol	1,16
29,58	1589	M = 222	5,75
29,69	1592	M = 204	0,30
31,05	1629	gama-eudesmol	0,60
31,71	1647	beta-eudesmol	0,63
31,83	1650	alfa-eudesmol	0,73
32,38	1665	bulnesol	0,90
Total			99,44

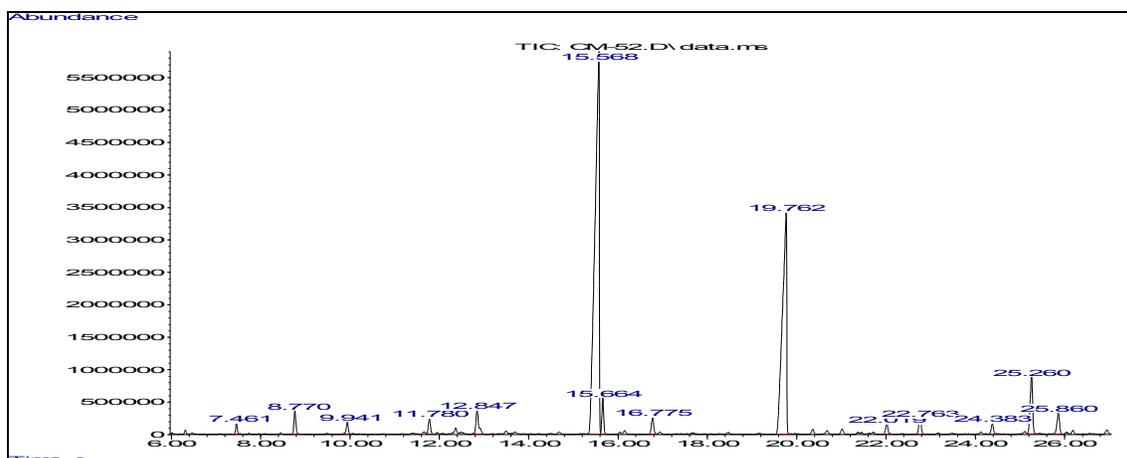


Figura 34 - Cromatograma expandido (6-26 min) da amostra CM-52

Tabela 8 – Identificação dos analitos da amostra CM-52

t _R (min)	IR	Identificação	% rel.
3,22	-----	n.i.	0,41
7,46	1027	limoneno	0,57
8,77	1066	hidrato de cis-sabineno	1,34
9,94	1101	linalol	0,79
11,78	1148	para-ment-3-en-ol	1,08
12,85	1175	M = 152	2,05
15,57	1241	pulegona	52,20
15,66	1244	carvona	2,00
16,78	1270	M = 150	1,17
19,76	1342	piperitenona	29,51
20,02	1349	M = 164	0,75
22,76	1415	trans-cariofileno	1,24
24,38	1456	beta-E-farneseno	0,77
25,26	1478	gama-muuroleno	4,44
25,86	1492	biciclogermacreno	1,69
Total			99,60

5.6 Cultivo celular para estudos de citotoxicidade e atividade antiproliferativa das frações de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52

Foram realizados ensaios de citotoxicidade das frações F2 e F3 de *Mentha suaveolens x spicata* utilizando painel de diferentes linhagens celulares, incluindo células epiteliais renais normais (Vero), além de 8 linhagens de células tumorais humanas.

Foi seguido o protocolo do laboratório de cultivo celular da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP (Divisão de Farmacologia e Toxicologia), que também avalia os efeitos de citotoxicidade, além de ser uma análise de rotina e que já foi utilizada em dezenas de projetos da DFT.

Para este estudo foi feita coleta da planta no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, a extração do seu óleo essencial (OE) e o fracionamento, para obtenção das frações F2 e F3 (melhores frações nos testes de biofilme de *C. albicans* SC 5314).

A Tabela 9 apresenta os resultados de eficácia das frações F2 e F3 obtidas de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 e do controle positivo Doxorrubicina sobre as linhagens celulares após 48 h de exposição.

A Figura 35 apresenta as curvas concentração-resposta das melhores frações (F2 e F3) e da doxorrubicina (controle) sobre linhagens celulares tumorais humanas, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da amostra teste utilizada.

A curva A demonstra que a fração F2 possui atividade antiproliferativa fraca (Tabela 9 - GI₅₀: 37,70 µg/mL a 189,1 µg/mL), apresentando seletividade para as linhagens de leucemia (K-562-GI₅₀: 37,7 µg/mL), mama (MCF-7-GI₅₀: 92,5 µg/mL) e melanoma (UAACC-62 GI₅₀: 189,1 µg/mL) (Tabela 9).

A curva B demonstra que a fração F3 não apresentou atividade antiproliferativa (valores de GI₅₀ acima de 250,00 µg/mL - Tabela 9) para a maioria

das linhagens, com efeito citostático apenas para a linhagem de leucemia K-562 (GI₅₀: 14,7 µg/mL).

A curva C ilustra a atividade antiproliferativa da Doxorrubicina (Tabela 3 - GI₅₀: 0,027 µg/mL a 0,45 µg/mL), usada como controle positivo, sendo que a linhagem de colon (HT29) e de pulmão (NCI-h-460) foram menos sensíveis a doxorrubicina (GI₅₀: >25 µg/mL).

Tabela 9. Eficácia das frações F2 e F3 obtidas de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 e do controle positivo Doxorrubicina sobre as linhagens celulares após 48 h de exposição.

Linhagens celulares	GI ₅₀ (µg/mL)								
	UACC-62	MCF7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	HT29	K-562	VERO
Doxorrubicin	0,20	0,027	0,082	0,028	>25,0	0,22	>25,0	<0,02	0,45
a								5	
<i>Mentha</i> F2	189,1	92,5	>250	>250	>250	250	>250	37,7	>250
<i>Mentha</i> F3	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	14,7	>250

UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 746-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); HT29 (colorretal); K562 (leucemia); VERO (rim, célula normal, macaco verde).

GI₅₀: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para que ocorra 50% de crescimento

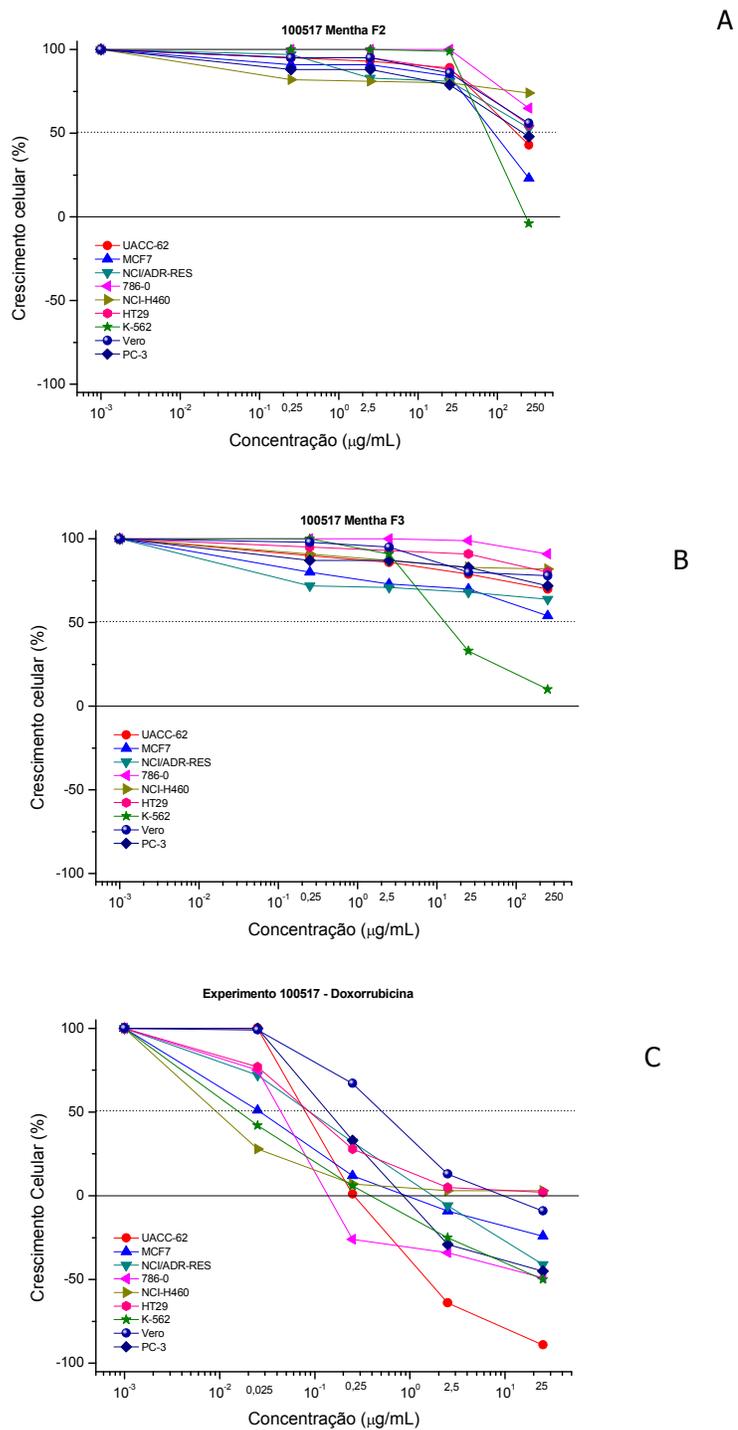


Figura 35. Atividade das frações de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 F2 (A) e F3 (B) e da Doxorubicina (C) sobre as linhagens celulares após 48 h de exposição.

6. Discussão

Diante da resistência de *Candida* às drogas antifúngicas comercialmente utilizadas, do elevado custo do tratamento e do alto índice de infecções hospitalares e taxa de mortalidade (Ramage *et al.*, 2005; 2009; Uppuluri *et al.*, 2009; 2010), houve um aumento da busca por medicamentos de origem natural, que proporcionassem maior segurança de uso e que fossem mais eficazes (Rodriguez & Fragoso, 2007; Tavares *et al.*, 2008).

Mentha spp. possuem um dos óleos essenciais mais consumidos do mundo com atividade antimicrobiana comprovada (Oumzil *et al.*, 2002; McKay & Bumber, 2006) e seus derivados já são largamente utilizados em produtos alimentícios, de higiene e cosméticos (Nair, 2001). Para selecionar os acessos que possuem propriedades anti-*Candida* e otimizar sua utilização industrial e melhoramento genético, no presente estudo foi realizada uma triagem de 64 diferentes acessos de *Mentha*, verificando, assim, seus rendimentos, e propriedades antimicrobianas.

As plantas foram cultivadas na CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA/UNICAMP (Tabela 1) e obtidas a partir de coletas realizadas no mesmo campo experimental. A coleta do material vegetal constitui a primeira etapa de uma investigação das propriedades biológicas de plantas medicinais (Simões & Spitzer, 2003). Os dados referentes à coleta das plantas, massa de planta utilizada, rendimentos e teor de umidade estão apresentados na Tabela 3.

Apesar das diferenças de rendimento em óleo essencial, os diferentes acessos de *Mentha* spp. estudados demonstraram baixo rendimento em óleo, entre 0,30 % e 1,5 % (base seca).

Esses resultados estão de acordo com o estudo de Deschamps *et al.* (2008), que realizou diferentes técnicas de cultivo para adaptação de *Mentha* spp., verificando seus respectivos rendimentos em óleo essencial. Esses autores também comprovaram grande variabilidade entre os rendimentos (de 0,15 % a 0,67 %), sugerindo que a biossíntese de óleo essencial seja decorrente de características

genéticas e fisiológicas da planta, condições climáticas, temperatura e exposição à radiação.

Os resultados do presente estudo ainda confirmam que diferentes acessos de uma mesma espécie de *Mentha* podem apresentar propriedades fisiológicas diferentes, conforme sugerido por diversos autores (Spirling & Daniel, 2001; Xu *et al.*, 2003; Mahboubi & Haghi, 2008). Pode-se citar como exemplo os diferentes acessos de *M. arvensis* L., que apresentaram distintos rendimentos em óleo essencial (CM 24 0,956 %; CM 26 0,156 %; CM 36 0,540 %; CM 46 1,018 %; CM 59 0,394 %; CM 66 0,170 %).

Os acessos ainda não identificados quanto à espécie (*Mentha* spp.) também mostraram diferentes teores em óleo essencial, assim como *M. piperita* L., *M. x piperita subsp Citrata* Ehrh, *M. spicata* L., *M. longifolia* L. Huds, *Mentha* spp. X *M. villosa* Huds, *M. aquatica*, *M. canadensis*, *Mentha x piperita*, *M. suaveolens* e *M. rotundifolia* (Tabela 3).

Os resultados em rendimento em óleo essencial obtidos para os acessos de uma mesma espécie cultivados sob mesmas condições de clima, solo, nutrição, irrigação, são devido a particularidades genéticas da planta. Isso demonstra a importância em selecionar os melhores genótipos dentro de uma mesma espécie e direcionar sua produção, de acordo com a finalidade do uso.

Após a extração dos óleos essenciais (OE), os mesmos foram testados para atividade antimicrobiana frente às células planctônicas de cepas de referência e de isolados clínicos de *Candida* spp.

O inóculo foi padronizado em meio RPMI-1640, conforme CLSI (2002). Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais encontram-se apresentados na Tabela 10 (Anexo VI).

Duarte *et al.* (2005) propuseram com base em um trabalho de Aligiannis *et al.* (2001), que concentrações inibitórias mínimas (CIM) de até 0,5 mg/mL, de 0,55 a 1,5 mg/mL e acima de 1,5 mg/mL apresentam, respectivamente, forte,

moderada e fraca atividade antimicrobiana. Desse modo, podemos considerar que os óleos brutos das plantas estudadas foram capazes de inibir diferentes espécies do gênero *Candida* demonstrando atividade moderada a fraca, apresentando valores de CIM maiores ou iguais a 1 mg/mL, como pode ser observado na Tabela 10 (Anexo VI).

Esses resultados estão de acordo com os estudos de Sartoratto *et al.* (2004), Duarte *et al.* (2005) e Mahboubi & Haghi (2008), os quais avaliaram a atividade de óleos essenciais de *Mentha* spp. frente a células de *C. albicans*. Duarte *et al.* (2005) avaliaram a propriedade antimicrobiana da *Mentha arvensis* var. *piperita* L., *Mentha piperita* L. e *Mentha pullegium* L., coletadas no CPQBA, com resultados de 1,1 mg/mL, 0,6 mg/mL e 0,74 mg/mL, respectivamente. Já Mahboubi & Haghi (2008) testaram a atividade antimicrobiana de *Mentha pulegium*, coletada no *Herbarium of Agriculture Departament* do Irã, sendo o valor de CIM igual a 1 mg/mL. Esses resultados sugerem que os óleos essenciais de *Mentha* spp. geralmente possuem atividade antimicrobiana moderada.

No presente estudo, apesar da maioria dos acessos de *Mentha* apresentarem atividade anti-*Candida* de moderada a fraca, alguns acessos se destacaram por sua forte atividade e com amplo espectro de ação. Estes foram *M. canadensis* CM 05, *M. spicata* CM 30, *M. arvensis* CM 36, *M. suaveolens x spicata* CM 52, os quais possuíram ação antimicrobiana até 0,500 mg/mL, exceto para a cepa de *C. albicans* 3 A5 de CM 36.

É importante esclarecer que, se o óleo ou extrato não são ativos até 100 µg/mL, provavelmente não terá uso clínico, uma vez que a maioria dos antifúngicos utilizados clinicamente possui concentração ativa em torno de 10 µg/mL. Caso o material vegetal bruto tenha uma atividade até 100 µg/mL, terá um bom potencial de aplicação prática, e dependendo da natureza química de seu componente responsável pela atividade, a técnica de fracionamento subsequente poderá melhorar ainda mais sua atividade (Rios *et al.*, 1988).

Mesmo assim, Mahboubi & Haghi (2008) sugerem o uso do óleo essencial de *Mentha pulegium* como alternativa ao uso de antifúngicos, já que esses últimos têm promovido resistência microbiana e efeitos adversos indesejáveis (Jewtuchowicz *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Rosato *et al.*, 2008). Mais estudos são ainda necessários para avaliar o valor prático dessa aplicação terapêutica (Mahboubi & Haghi, 2008), bem como padronização da técnica experimental, para maiores comparações entre os estudos (Jansen *et al.*, 1987).

Os resultados do presente estudo ainda comprovam que a mesma espécie de *Mentha* pode apresentar diferenças nas suas propriedades, conforme sugerido por diversas pesquisas (Spirling & Daniel, 2001; Xu *et al.*, 2003; Mahboubi & Haghi, 2008). A espécie *Mentha arvensis* L. apresentou CIM maior que 1 mg/L para a maioria das cepas da CM 46 e CM 59, enquanto que para CM 36, quase todas as cepas apresentaram CIM menores que 1 mg/mL. Já *Mentha* sp. mostrou os mesmos resultados entre a CM 51 e CM 56 e entre a CM 57, CM 62 e CM 63, embora os dois grupos sejam diferentes entre si. A CM 70 e CM 72, ambas pertencentes à mesma espécie, diferem apenas para a cepa 3 A5 (menor que 0,007 mg/mL e 0,015 mg/mL, respectivamente). *Mentha piperita* apontou os mesmos resultados para seus diferentes acessos, assim como *Mentha x piperita subsp Citrata* Ehrh. A *Mentha spicata* L. (CM 17, CM 30, CM 33 e CM 41) obteve diferentes respostas para as cepas de *C. dubliensis*. Ainda CM 30 apresentou resultados com amplo espectro a baixas concentrações, diferentemente das demais. *Mentha longifolia* L. Huds diferiu apenas para a cepa 3 A5 (0,046 mg/mL para CM 27 e maior que 1 mg/mL para CM 40). *Mentha* sp. X *M. villosa* Huds diferiu para a cepa 26 A4 (CM 28 acima de 1 mg/mL e CM 38 0,500 mg/mL). Os resultados estão mais detalhados na Tabela 10 (Anexo VI). Esses resultados quando analisados em conjunto demonstram a importância em se estudar diferentes acessos ou genótipos de plantas. Independentemente da espécie, diferentes acessos podem apresentar diferentes propriedades.

Na comparação dos resultados obtidos das plantas medicinais estudadas com a de antifúngicos disponíveis comercialmente, foi determinada a CIM desses compostos para as mesmas cepas de referência e isolados orais de *Candida* spp. (Tabela 11, Anexo VII). O antifúngico utilizado foi o poliênico Nistatina (Merck®) (fungicida).

O poliênico Nistatina apresentou atividade antimicrobiana superior aos óleos essenciais de *Mentha* testados, com resultados de CIM variando de 3,9 µg/mL a 7,8 µg/mL, enquanto os óleos apresentaram CIM variando de 0,007 mg/mL a 1 mg/mL.

Os resultados obtidos demonstram que os óleos essenciais não apresentaram CIM superiores às observadas para as drogas utilizadas clinicamente já descritas. Isso, no entanto, não inviabiliza o uso futuro da *Mentha* spp. como antimicrobiano, uma vez que há vários relatos na literatura apontando para o potencial antimicrobiano dessa espécie. Pesquisas sucessivas que venham esclarecer as diversas propriedades dos extratos e óleos dessas plantas do ponto de vista fisiológico, bioquímico e genético, assim como o conhecimento de seus componentes bioativos estarão, sem dúvida, na pauta de pesquisadores que atuam nessa área, visando o uso de produtos naturais provenientes de extratos de plantas que substituam ou atuem sinergicamente aos antifúngicos sintéticos disponíveis no comércio e que possam ser uma alternativa economicamente viável.

Diante dos resultados obtidos, os óleos de *M. canadensis* CM 05, *M. suaveolens x spicata* CM 52, *M. spicata* CM 30 e *M. arvensis* CM 36, foram selecionados para avaliação da atividade antimicrobiana em biofilmes de *Candida* spp. Além disso, foram feitas análises microscópicas (observação de dados relacionados à estrutura do biofilme) e cromatográficas para testes das frações em biofilmes.

As análises cromatográficas permitiram definir a composição química desses óleos, importantes para identificar o composto ativo dos óleos de melhor

atividade antimicrobiana. Essas análises foram feitas com base na grande variação encontrada na composição química de óleos essenciais de *Mentha* spp. (Jansen *et al.*, 1987). Nesse estudo foram realizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM), considerada metodologia padrão para análise de óleos essenciais voláteis (Pettrakis *et al.*, 2009).

Os resultados mostraram que foi possível obter elevados rendimentos a partir do fracionamento dos óleos essenciais, com valores percentuais acima de 90% para a maioria dos óleos. Apenas para o óleo proveniente do acesso CM 30 foi obtido rendimento em frações menores do que 50 % (Tabela 4). Ainda que se empregue a mesma metodologia e técnica para o fracionamento, pode-se observar uma variabilidade no rendimento das frações dos acessos de *Mentha*. Esses dados sugerem que as propriedades genéticas de cada acesso podem influenciar no rendimento das frações, quando submetidas ao mesmo tratamento.

A CCD foi a técnica utilizada para escolher o melhor solvente a ser utilizado na Cromatografia em Coluna Seca, além de monitorar os compostos dos óleos essenciais de melhor atividade antimicrobiana e suas frações. Essa técnica é considerada simples e muito importante para análises qualitativas rápidas, extremamente efetiva e conveniente para o isolamento de pequenas quantidades de frações de misturas complexas ou na purificação de substâncias. Além disso, é utilizada para identificar componentes de uma mistura comparando-os com padrões e para acompanhar o processo de uma reação pelo aparecimento dos produtos e para um simples monitoramento das condições de extração.

Apesar de todos os óleos apresentarem compostos de média polaridade, conforme ilustrado na CCD (Figura 2), a CG-EM revelou diferentes compostos majoritários para cada espécie de *Mentha* testada (Figuras 31 a 34 e tabelas 5 a 8). O presente estudo está de acordo com Deschamps *et al.* (2008) e Mkaddem *et*

al. (2009), que também encontraram grande variabilidade nos composições de diferentes acessos de óleos essenciais de *Mentha*.

Os óleos essenciais de *Mentha* representam uma complexa mistura de diferentes compostos químicos, sendo seus principais constituintes pertencentes à classe dos monoterpenos (Mahamoud & Croteau, 2001), conforme os compostos majoritários identificados nos óleos do presente estudo.

Os monoterpenos são compostos de baixo peso molecular formados por unidades de isótopos, com cadeias até 10 Carbonos, constituindo juntamente com os sescterpenos os óleos essenciais (Lorenzi & Matos, 2002). Por serem moléculas pequenas e, conseqüentemente com maior facilidade de penetração celular, sugere-se que são compostos que possuem maior potencial antimicrobiano do que os extratos vegetais. O mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos não está esclarecido. Apesar disso tem sido sugerido que seu mecanismo de ação ocorre através do rompimento da membrana celular, pela afinidade dos seus componentes lipofílicos (Schelz *et al.*, 2006), inclusive pela ação dos compostos da classe terpenos (monoterpenos e sescterpenos) (Mkaddem *et al.*, 2009). Assim, a identificação dos compostos dos óleos essenciais do presente estudo pode contribuir para elucidar os mecanismos de ação antimicrobianos moleculares em estudos farmacológicos posteriores.

No óleo essencial de CM 52, os compostos majoritários foram os cetônicos, Pulegona (52,20 %) e Piperitenona (29,51 %), encontrados comumente no gênero *Mentha* (Sutour *et al.*, 2010), inclusive na *M. piperita*. Pulegona é considerado tóxico, por seu metabolismo hepático que ativa a enzima P-450, liberando mentofurano. Por isso esse composto é recomendado na concentração de até 1 % para uso em cosméticos (Nair, 2001).

Os compostos majoritários do óleo de *M. canadensis* CM 05 foram carvona (74,84 %), linalol (4,84 %) e acetato de dihidro carveol (2,04 %). Já Sivropoulou *et al.* (1995) encontraram carvona como composto majoritário para *M. spicata*. No

presente estudo o composto majoritário de *M. spicata* CM 30 foi o óxido de piperitenona (28,05 %). Já os compostos majoritários do óleo de *M. arvensis* CM 36 foram linalol (33,24 %), acetato de linalol (21,97 %) e alfa-terpineol (11,77 %). Deschamps *et al.* (2008) encontraram alfa-terpineol (9,6 %) como composto majoritário, embora obtiveram muitos compostos não identificados em sua análise. Esses dados ilustram a necessidade de realizar a identificação dos compostos dos óleos essenciais de *Mentha* spp., por meio da CG-EM. Apesar da mesma espécie, óleos originados de acessos diferentes podem apresentar variações dos seus compostos constituintes e, conseqüentemente, de suas propriedades.

Pode-se sugerir que o metabolismo específico de cada material genético resulta em teores diferenciados de monoterpenos nas espécies aromáticas incluídas neste trabalho, como pode ser observado no presente trabalho para os acessos de *M. canadensis* CM 05, *M. spicata* CM 30, *M. arvensis* CM 36 e *M. suaveolens x spicata* CM 52. A importância do teor de monoterpenos entre diferentes espécies encontra-se na sua relação diretamente proporcional ao rendimento do óleo (Dechamps *et al.*, 2008).

Os testes com os óleos essenciais e frações dos acessos de *Mentha* spp. de melhor atividade antimicrobiana foram realizados contra biofilme de *C. albicans* SC 5314. Foram utilizadas placas de 96 poços para desenvolvimento do biofilme, e em seguida o biofilme maduro e em formação foi submetido a diferentes concentrações dos óleos e frações, seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Foram também testados agentes antifúngicos comerciais.

O método utilizado, segundo Pierce *et al.* (2008), permite verificar medidas semi quantitativas da formação de biofilme, por meio de uma metodologia simples e reprodutível, já testado em diversos estudos (Ramage & López-Ribot, 2005; Ramage *et al.*, 2001). A leitura feita com ensaio utilizando o corante XTT mede a atividade metabólica das células. A leitura feita com ensaio utilizando o corante XTT mede atividade metabólica das células. Além disso, é uma técnica que requer

mínima manipulação do material a ser quantificado, quando comparado com outras técnicas, como contagem de células viáveis (Ramage *et al.*, 2009). Por isso, esse método de quantificação permite menos variáveis, pela simplicidade da técnica, com conseqüente conservação das células a serem quantificadas.

De acordo com os pesquisadores, esse é um modelo ideal para testar substâncias com potencial antifúngico (Ramage & López-Ribot, 2005; Ramage *et al.*, 2001), como os óleos essenciais de *Mentha* spp. que se destacaram quanto a sua atividade anti-*Candida* em células planctônicas de cepas de referência e isolados clínicos orais.

Nesse estudo, os resultados mostraram ausência de ação antimicrobiana dos óleos essenciais contra biofilme de *C. albicans* SC 5314 (Figuras 3 a 6), apesar de algumas frações apresentarem atividade. Isso pode ser explicado pelo fato de determinado composto do óleo essencial se encontrar mais concentrado em algumas de suas respectivas frações, ou por sinergismo entre determinados compostos constituintes das mesmas.

As frações de melhor atividade foram F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52, pois foram as únicas que demonstraram ação de inibir a formação de biofilme e também contra biofilme maduro de *C. albicans* em baixas concentrações (Figuras 23 e 24), inibição de 49 % e de 38 %, a 0,5 mg/mL. As outras frações que foram CM 52 – F4; CM 30 – F2, F3, F4 e F5 e CM 36 – F1, F2, F3, F4 apenas inibiram que o biofilme fosse formado, sem atividade sobre biofilme maduro em baixas concentrações.

Essas frações (CM 52 - F2 e F3; CM 30 - F3, F4 e F5 e CM 36 - F2 e F3), assim como os antifúngicos testados apresentaram melhores resultados sobre o biofilme em formação do que sobre o biofilme maduro, indicando que uma vez formado, o biofilme apresentou elevados níveis de resistência aos tratamentos utilizados, assim como verificado no trabalho de Ramage *et al.* (2001).

Tais resultados sugerem que o biofilme formado por *C. albicans* pode persistir principalmente quando se trata de agentes antifúngicos azólicos (Fluconazol) e poliênicos (Anfotericina B), que são os agentes mais comumente utilizados (Baillie & Douglas, 1999; Ramage *et al.*, 2005). Os resultados do presente estudo confirmam a elevada resistência do biofilme ao Fluconazol, que obteve inibição < 40% em todas as concentrações testadas e a Anfotericina B, com inibição de 62 % na concentração de 1 µg/mL. Nessa mesma concentração, a Anfotericina B apresentou inibição de 75 % para biofilme em formação, enquanto Fluconazol apresentou entre 64 % e 70 % de inibição em todas as concentrações testadas (Figuras 27 e 28).

Conforme os resultados obtidos, as frações F2 e F3 de *M. suaveolens x spicata* CM 52 demonstraram melhor atividade dentre os óleos e frações testados contra biofilme de *C. albicans*. Assim essas frações foram selecionadas para testes em microscopia óptica e confocal a laser, bem como avaliação de sua citotoxicidade, como avaliação para segurança de uso clínico.

Os resultados da microscopia confocal a laser (Figura 30) mostram que o biofilme maduro de *C. albicans* SC 5314 sofreu inibição de 57 % na presença da fração F2, enquanto a fração F3 permitiu uma redução de 61 % do biofilme maduro. Esses dados confirmam os obtidos para aqueles de densidade óptica apresentados nas Figuras 23 e 24 e análises por microscopia óptica para o biofilme de *C. albicans* SC 5314 cultivada na presença das frações F2 e F3 do acesso de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 e sobre biofilme maduro, confirmando que estas são efetivas no controle do crescimento celular do biofilme em formação, tendo um efeito também sobre o biofilme maduro.

Para testar sua segurança para posterior uso clínico, essas frações também foram selecionadas para avaliação de sua citotoxicidade em painel de células normais e diferentes linhagens de células tumorais humanas.

Considerando a importância de diversos estudos sobre atividade de plantas medicinais com potencial aplicação na terapêutica do câncer (Denny *et al.*, 2007) e da presença de compostos antioxidantes em óleos essenciais de diversas espécies de *Mentha*, foi incluído no presente trabalho o estudo da atividade antiproliferativa das frações de *Mentha suaveolens x spicata* (F2 e F3), de melhor atividade antimicrobiana em biofilme de *C. albicans* SC 5314, sobre células tumorais humanas.

Neste modelo, uma das formas de se inferir a porcentagem de crescimento é através da leitura espectrofotométrica da absorbância de proteínas celulares coradas com Sulforrodamina B (SRB), um corante aniônico de coloração rosa brilhante. Esse corante é capaz de ligar-se às terminações básicas de aminoácidos protéicos de células vivas fixadas com ácido tricloroacético (TCA), sendo assim um ensaio independente do metabolismo celular e permitindo uma quantificação sensível de proteínas de modo linear com o número de células da cultura. O ensaio de SRB é consideravelmente rápido, simples e apresenta sensibilidade comparável àquelas das metodologias fluorescentes e superior aos ensaios que utilizam corantes visíveis, mesmo em baixas concentrações celulares (1000 a 2500 células por compartimento) (Skehan *et al.*, 1990).

Este ensaio tem sido utilizado na avaliação da atividade antitumoral através da exposição de células tumorais humanas, em fase exponencial de crescimento, a diferentes concentrações da amostra com a finalidade de verificar se essa exposição induz uma interrupção na taxa de crescimento sem morte celular (atividade citostática) ou se provoca a morte celular (atividade citocida) (Shoemaker, 2006), o que justifica o seu uso na avaliação da citotoxicidade das frações obtidas de acessos de *Mentha* spp.

O quimioterápico Doxorubicina foi empregado como controle positivo. Mais do que um padrão de comparação, o objetivo principal do uso desse controle foi o de verificar se todas as linhagens empregadas mantinham o perfil de resposta

ao quimioterápico. Isto porque com as sucessivas passagens necessárias para a manutenção da cultura de células, existe a possibilidade de mutação da linhagem em cultivo, e essa mutação poderia ser detectada pela mudança de resposta frente à Doxorubicina.

Os resultados mostraram que as frações de *Mentha* selecionadas no presente trabalho possuíram efeito citostático apenas para a linhagem de leucemia K-562. As frações não foram capazes de interferir no metabolismo das demais linhagens de células tumorais avaliadas. A atividade antiproliferativa foi bastante semelhante em ambas as frações, principalmente quanto à seletividade para a linhagem de leucemia (K-562).

Quanto aos efeitos sobre células epiteliais normais, as frações F2 e F3 de *Mentha suaveolens x spicata* não tiveram influência sobre o metabolismo das mesmas, indicando que as frações apresentaram ausência de citotoxicidade significativa para as células testadas.

Apesar dos resultados de atividade antimicrobiana obtidos mostrarem que os óleos essenciais e suas frações não apresentaram valores de inibição superiores aos observados para as drogas utilizadas como padrão, o fato dos ensaios de citotoxicidade terem mostrado que as frações de *Mentha* não interferiram no metabolismo das células epiteliais renais testadas (células VERO – macaco verde), sugere haver uma seletividade de ação antimicrobiana para *Candida* sem afetar negativamente as células de mamíferos, apontando para o potencial de segurança dessas frações como medicamento.

Isso pode viabilizar o uso futuro dessas frações de *Mentha* como antimicrobiano, uma vez que demonstram potencial de aplicação como antimicrobiano e seletividade de ação. Além disso, as indústrias de fitofármacos estão interessadas na obtenção de produtos naturais, considerando-se, provavelmente, uma alternativa economicamente viável.

No entanto, pesquisas que objetivam viabilizar o uso de extratos de plantas e/ou seus componentes bioativos como alternativa aos quimioterápicos e/ou antifúngicos, tem ainda muito a considerar, levando-se em conta a ampla diversidade e complexidade de suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, quando comparadas a produtos sintéticos ou biossintéticos de drogas antimicrobianas que vem sendo utilizadas desde o século passado.

O conhecimento do mecanismo de resistência a drogas a esses componentes, a detecção de efeitos citotóxicos ou citocidas e efeitos sobre células epiteliais normais poderão ser fatores decisivos na procura de alternativas viáveis do uso de produtos naturais de efeito antimicrobiano e de uso mais amplo na área da saúde.

Os dados da presente pesquisa abrem perspectivas futuras de melhoramento genético da *M. suaveolens x spicata* CM 52, testes farmacológicos, uso de recursos biotecnológicos com aplicação dessas frações e expressão gênica de *C. albicans* quando submetida a esses componentes de extratos de plantas. Assim, esses dados deverão ampliar as pesquisas que têm sido levadas a efeito nessa linha de investigação.

Conclusões

- Os óleos essenciais de *Mentha* spp. apresentam atividade antimicrobiana contra células planctônicas de *Candida* spp. (de moderada a fraca), exceto os óleos originados dos acessos de *M. canadensis* CM 05, *M. spicata* CM 30, *M. arvensis* CM 36 e *M. suaveolens x spicata* CM 52.
- As frações F2 e F3 de *Mentha suaveolens x spicata* CM 52 demonstram efeito antimicrobiano inibitório sobre biofilme em formação e sobre biofilme maduro, além de ausência de citotoxicidade para células de mamífero.
- Os óleos essenciais de *Mentha* spp. não apresentam efeito inibitório sobre o biofilme de *C. albicans* SC 5314, embora algumas frações apresentem efeito inibitório sobre biofilme em formação.
- Os acessos de *Mentha* spp. apresentam baixo rendimento, com grande variação no teor dos óleos essenciais.
 - O acesso *M. rotundifolia* CM 31 (1,5 %, base seca) se mostra mais satisfatório no rendimento em óleo essencial.
- O biofilme formado de *C. albicans* demonstra elevados níveis de resistência aos antifúngicos e frações obtidas dos acessos de *Mentha* spp.

8. Referências*

Adams RP. Identification of essential oils components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th edition, Allured Publishing Corporation, IL:2007 USA

Aliγιannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsarbopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. J. Agric Food Chem. 2001 Feb;49(2):811-5.

Akdogan M, Ozugner M, Aydin G, Gokalp O. Investigation of biochemical and histopathological effects of Peperment *piperita* Labitae and Peperment *spicata* Labiatae on liver tissue in rats. Hum Exp Toxicol. 2004; 23:21-28.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J 2002; 78(922): 455-9.

Alves SH, Milan EP, Moretti-Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K Oliveira LO, *et al.* First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 39(3): 165-8.

Angioni A, Barra A, Arlorio M, Coisson JD, Russo MT, Pirisi FM, Satta M, Cabras P. Chemical composition, plant genetic differences, and antifungal activity of the essential oil of *Helichrysum italicum* G. Don ssp. *microphyllum* (Willd) Nym. J Agric Food Chem. 2003 Feb 12;51(4):1030-4.

Bagg J, Silverwood RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. J Med Microbiol 22: 165-9, 1986.

Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol. 1999 Jul;48(7):671-9.

Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2000; 46: 397-403.

Barbedo LS, Sgarbi DBG. Candidíase. J Bras Doenças Sex Transm 2010; 22(1): 22-38.

Barros LM, Boriollo MF, Alves AC, Klein MI, Gonçalves RB, Höfling JF. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. Arch Oral Biol. 2008 Jul 29. [Epub ahead of print]

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Comittee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com Medline.

Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat Rev Genet. 2002 Dec;3(12):918-30. Review.

Bonamonte D, Mundo L, Daddabbo M, Fotti C. Allergic contact dermatitis from *Mentha spicata* (spearmint). Contact Dermatitis. 2001 Nov;45(5):298.

Branting C, Sund ML, Linder LE. The influence of *Streptococcus mutans* on adhesion of *Candida albicans* to acrylic surfaces *in vitro*. Arch Oral Biol. 1989;34(5):347-53.

Brown AJB, Gow NAR. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. Trends Microbiol 1999; 7(8): 333-338.

Bush TM, Rayburn KS, Holloway SW, Sanchez-Yamamoto DS, Allen BL, Lam T, et al. Adverse interactions between herbal e dietary substances and prescription medications: a clinical survey. Altern Ther Health Med. 2007; 13: 30-35.

Buzzini P, Martini A. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3362-3364.

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

Centeno A, Dvis CP, Cohen MS, Warren MM. Modulation of *Candida albicans* attachment to human epithelial cells by bacteria and carbohydrates. Infect Immun. 1983 Mar;39(3):1354-60.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol R 1998; 62(1): 130-180.

Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78, 202-210.

Chandra, J. *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. J. Bacteriol. 2001; 183: 5385-5394.

Chen Y. Method of treating *Candida* and *Cryptococcus* fungal infections by administering gentian, U.S. Patent US 5837254 A, 1996.

CLSI (2002). Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Clinical and Laboratorial Standards Institute. CLSI Norma M27-A2, v.22, n.15, 2 ed.

Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(5): 599-607.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér AS, Arthington-Skaggs B, Matta DA *et al.* Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2816-2823.

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

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49:711-45.

da Cruz GA, de Toledo S, Sallum EA, Sallum AW, Ambrosano GM, de Cássia Orlandi Sardi J, da Cruz SE, Gonçalves RB. Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2008 Jul; 79(7):1150-7.

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

Dechamps C, Zanatta JL, Bizzo HB, Oliveira MC, Roswalka RC. Avaliação sazonal do rendimento em óleo essencial de espécies de *Mentha*. *Ciênc Agrotec.* 2008; 32 (3):725-730.

Denny C, Zacharias ME, Ruiz ALTG, Amaral MCE, Bittrich V, Kohn LK, *et al.* Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Viola sebifera* leaves. *Phytother Res.* 2008; 22:127-130.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1387-1392.

Dougherty SH. Pathobiology of infection in prosthetic devices. *Reviews of infectious diseases.* 1988; 10: 1102-17.

Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martínez-Suárez JV, Rodríguez-Tudela JL, González-López A, Valencia E. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Jun;15(6):446-52.

Duarte MCT, Figueira GM, Sartorato A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*candida* activity of brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005; 305-11.

Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à análise Fitoquímica. In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Simões *et al.*, 2003; 5ed. Editora UFRS, Porto Alegre.

FDA. Modification in voluntary filling of cosmetic product ingredient and cosmetic raw composition statements. Final rule. Fed Register 1992; 52:3128-30.

Feller L, Lemmer J. Necrotizing periodontal diseases in HIV-seropositive subjects: pathogenic mechanisms. J Int Acad Periodontol. 2008 Jan;10(1):10-5.

Fotedar R, Al Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. Mycoses. 2004; 47(3/4): 150-5.

Freitas MSM, Martins MA, Vieira IJC. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Pesq agropec bras. 2004; 39 (9): 887-94.

Friedman G. Treatment of the irritable bowel. Gastroenterol Clin North Am 1991; 20:325-33.

Furuhata K, Dogasaki C, Hara M, Fukuyama M. Antibacterial activities of several herbes on *Legionella Pneumophila*. J Azabu Univ 2000; 1/2: 15-20.

Gagnier JJ, DeMelo J, Boom H, Rochon P, Bombardier C. Quality of reporting of randomized controlled trials of herbal medicine interventions. Am J Med. 2006; 119:1-11.

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

Gurib-Fakin A. Medicinal plants: tradition of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med. 2006; 27:1-93.

Hägewald S, Bernimoulin JP, Köttgen E, Kage A. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. J Periodontal Res. 2002 Oct;37(5):333-9.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol. 2001 Dec;9(12):591-6. Review.

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

Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. Mol Biol Cell 2005; 16: 4814-4826.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology 2001; 147(8): 1997-2005.

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

Jainkittivong A, Johnson DA, Yeh CK. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13(3): 181-7.

Janssen AM, Schefer JJC, Baerheim SA. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods. *Planta Med* 1987; 53:395-398.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. *Oral Dis* 2004 Mar;10(2):106-12.

Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finquelievich JL, Lovannitti CA, Rosa AC. Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontol Latinoam* 2007; 20(1):17-22.

Jong AY, Stins MF, Huang S-H, Chen SHM, Kim KS. Traversal of *Candida albicans* across human blood-brain barrier *in vitro*. *Infect Immun* 2001; 69(7): 4536-4544.

Kaffenberger RM, Doyle MJ. Determination of menthol and menthol glucuronide in human urine by gas chromatography using an enzyme-sensitive internal standard and flame ionization detection. *J Chromatogr* 1990 Apr 27;527(1):59-66.

Kanerva L, Rantanen T, Aalto-Korte K et al. A multicenter study of patch test reactions with dental screening series. *Am J Contact Dermat* 2001; 12:83-7.

Knight SAB, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect Immun* 2005; 73(9): 5482-5492.

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993; 175:3247-52.

Kunamoto CA. *Candida* Biofilms. *Current Opinion in Microbiology.* 5: 608-611, 2002.

Lee DY, Park YC, Kim HJ, Ryu YW, Seo JH. Proteomic analysis of *Candida magnoliae* strains by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2003 Dec; 3(12):2330-8.

Lee SB, Cha KH, Kim SN, Altantsetseg S, Shatar S, Sarangerel O, Nho CW. The antimicrobial activity of essential oil from *Dracocephalum foetidum* against pathogenic microorganisms. *The Journal of Microbiology* 2007; 45 (1): 53-57.

Lentz DL, Clark AM, Hufford CD, Meurer-Grimes B, Passreiter CM, Cordero J, Ibrahimi O, Okunade AL. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1998; 63: 253-263.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Computação gráfica Osmar Gomes. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2002.

Maccarinelli G, Belotti R, Savoldi E, Gervasoni M, Cocchi D. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* of polymorphonuclear cells in patients with organ transplant of periodontal disease. *Minerva Stomatol.* 2001 Nov-Dec;50(11-12):345-9.

Magee BB, Magee PT. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 187-193.

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

Mahamoud SS, Croteau RB. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *PNAS.* 2001; 98 (15): 8915-20.

Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol.* 2008 Sep 26;119(2):325-7. Epub 2008 Jul 25.

Maniacal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 1323-1329.

Marsh PD. Are dental diseases examples of dental catastrophes? *Microbiol.* 2003; 149:279-94.

Martínez M.J., Betancourt J., Alonso-González N., Jauregui A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, *c* 52(3): 171-174, 1996.

Martins CAP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. *Braz. J. Microbiol.* 33: 236-240, 2002.

Masuoka J, Hazen KC. Cell wall proteinmannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology* 1997; 143, 3015-3021.

Masuoka J, Wu G, Glee PM, Hazen KC. Inhibition of *Candida albicans* attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 24, 421-429.

McKay DL, Bumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytoterapy Research* 2006; 20: 619-33.

McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux M-E et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2008; 46(2): 652-664.

Melzer J, Rösch 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.

Menezes EA, Cavalcante MS, Farlas RB, Teixeira AB, Pinheiro FG, Bezerra BP et al. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de fortaleza. J Bras Patol Med Lab 2005; 41(1): 9-13.

Menezes EA, Guerra ACP, Rodrigues RCB, Peixoto MMLV, Lima LS, Cunha FA. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do banco de leite humano da universidade federal do ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. J Bras Patol Med Lab 2004; 40(5): 299-305.

Millon L, Manteaux A, Reboux G, Drobacheff C, Monod M, Barale T, Michel-Briand Y. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. J Clin Microbiol. 1994 Apr;32(4):1115-8.

Milan EP, De Laet Sant'ana P, De Azevedo Melo AS. et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 41(1/2): 29-35.

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: 358-63.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 1991; 83: 757-766.

More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. J Ethnopharmacol. 2008 Jul 10.

Naglik JR, Challacombe J, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol R 2003; 67(3): 400-428.

Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to human buccal epithelial cells *in vitro*. J Med Microbiol. 1996 Sep;45(3):179-85.

Nair B. Final report on the safety assessment of *Mentha Piperita* (Peppermint) Oil, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf Extract, *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf, and *Mentha Piperita* (Peppermint) Leaf Water. Int J Toxicol. 2001;20 Suppl 3:61-73. Review.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Xavierb L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J Ethnopharmacol 53(3): 143-147, 1996.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. J Dentistry 1998; 26: 299-304.

Odds FC. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. Antimicrob Agents Ch 1993; 37(4): 685-691.

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

Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion to denture acrylic surfaces and relative cell-surface hydrophobicity of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. APMIS. 1998 Jul;106(7):736-42.

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, E Edwards J, 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.

Persons DA, Laughlin M, Tanner D, Perfect J, Gockerman JP, Hathorn JW. Fluconazole and *Candida krusei* fungemia. N Engl J Med. 1991 Oct 31;325(18):1315.

Petrakis EA, Kimbaris AC, Pappas CS, Tarantilis PA, Polissiou MG. Quantitative determination of pulegone in pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. J Agric Food Chem. 2009 Nov 11;57(21):10044-8.

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

Luis F. Cuevas-Glory, Jorge A. Pino, Louis S. Santiago and E. Sauri-Duch A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. Food Chem. 2007; 103 (3):1032-1043.

Pitter MH, Hernest E. Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and methanalysis. Am J Gastroenterol 1998; 93: 1131-35.

Plummer N. New antimicrobial compositions which colonise the small intestine – contain non-pathogenic microorganisms and *Allium* plant material; for treating gastrointestinal and urogenital disease. U.S. Patent EP554319-A. 1992.

Pfaller MA, Diekema DA. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-163.

Portela MB, Souza IP, Costa EM, Hagler AN, Soares RM, Santos AL. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42, 5925-5927.

Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010 Jul;44(3):272-6. Epub 2010 May 27

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Euk Cell* 2005; 4:633-8.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, López-Ribot JL. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Reviews Microbiol* 2009; 35 (4): 340-55.

Ramage G, López-Ribot JL. Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods in Molecular Medicine* 2005. Ed. PD Rogers, Humana Press.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98:53-9.

Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2475-9.

Reynaud AH, Nygaard-Østby B, Bøygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001 Sep;28(9):860-4.

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

Rodrigues-Fragoso L. Risks and benefits of commonly used herbal medicine in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007: 2-11.

Rojas G., Lévaro J., Tortoriello J., Navarro V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74(1): 97-101.

Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine.* 2008 Aug;15(8):635-8. Epub 2008 Jun 24. b

Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. APMIS. 1995 Oct;103(10):707-13.

Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BP, Jayatilake JA, Yeung KW, Yau JY, Samaranayake LP. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. APMIS 2006; 114, 857-866.

Sardi JCO, Duque C, Mariano FS, Peixoto ITA, Hofling JF, Gonçalves RB. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. J Oral Sci 2010; 52(2): 177-18.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2004; 35:275-80.

Sandven P. Epidemiology of candidemia. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 73-81.

Saville SP, Lazzel AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nat Rev Genet. 2002 Dec;3(12):918-30. Review.

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

Shale TL, Stirk WA, van Staden J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for antibacterial and anti-inflammatory activity. J Ethnopharmacol. 1999 Nov 30;67(3):347-54.

Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. Nat Rev Cancer 2006; 6: 813-823.

Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine. 2003; 10 (6-7):504-10.

Silva KL, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. Química Nova 2002; 25: 449-454.

Simões CMO, Spitzer V. Óleos Voláteis. In: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Simões *et al.*, 2003; 5ed. Editora UFRS, Porto Alegre.

Sivropoulou A, Kokkimi S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial activity of mint essential oils. J Agric Food Chem. 1995; 43:2384-88.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Nat Cancer Inst 1990; 82 (13): 1107-1118.

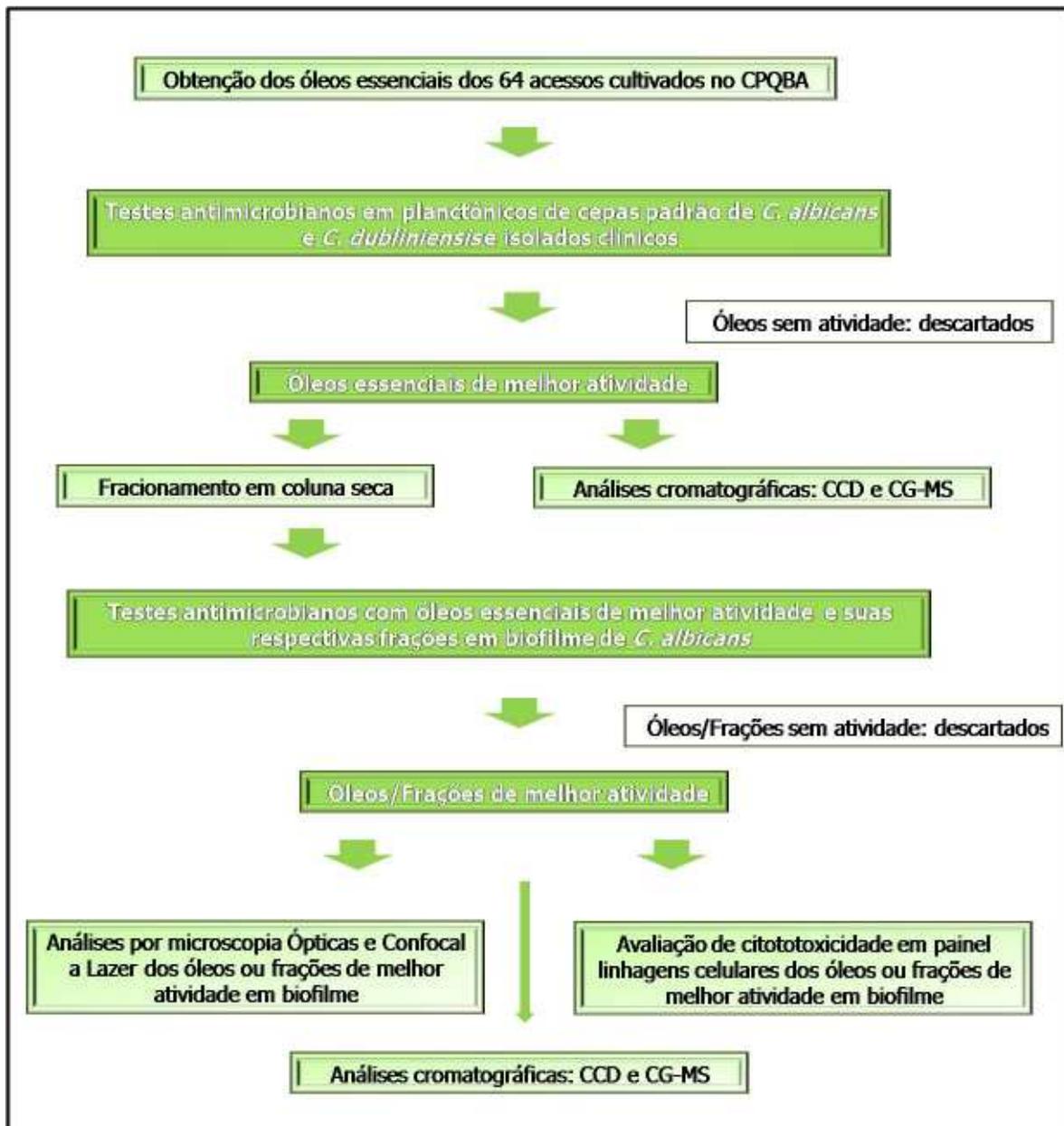
- Spirling LI, Daniels IR. Botanical perspectives on health peppermint: more than just an after-dinner mint. *J R Soc Health*. 2001 Mar;121(1):62-3. Review.
- Suci PA, Tyler BJ. Action of chlorhexidine digluconate against yeast and filamentous forms in an early-stage *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Nov;46(11):3522-31.
- Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004 Jul;12(7):317-24. Review.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. *Curr Top Med Mycol*. 1998; (8): 15–25.
- Sullivan DJ, Moran G, Donnelly S, Gee S, Pinjon E, McCartan B *et al*. *Candida dubliniensis*: an update. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 72-76.
- Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F *et al*. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* 2005; 159: 339-45.
- Tavares AC, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, Salgueiro LR. Essential oil of *Daucus carota subsp. halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J Ethnopharmacol*. 2008 Sep 2;119(1):129-34. Epub 2008 Jun 20.
- Tiraschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernández N, Kurlat I *et al*. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 263-267.
- Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R *et al*. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1843-1850.
- Uppuluri P, Pierce CG, López-Ribot JL. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol* 2009; 4 (10): 1235-1237.
- Villar CC, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cell. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 262-269.
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*. 2005 Mar;76(2):233-6.
- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*. 1998 Feb;43(1):45-50.
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25(4):365-404.

Xu P, Jia W, Bi L, Liu X, Zhao Y. Studies on components and quality of essential oil from *Mentha piperita* L. produced in Xinjiang, China. Chem Ind Forest Prod 2003; 23: 43-45.

Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry. 2006 Jun;67(12):1249-55. Epub 2006 Jun 14.

Anexo I

Fluxograma da Metodologia dos experimentos realizados



Anexo II

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Ação de óleos essenciais de <i>Mentha spp.</i> sobre a formação do biofilme em <i>Candida spp.</i>", protocolo nº 060/2008, dos pesquisadores IZA TEIXEIRA ALVES PEIXOTO e JOSE FRANCISCO HÖFLING, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/06/2008.</p>	
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Activity of <i>Mentha spp.</i> essential oils on <i>Candida spp.</i> biofilm formation", register number 060/2008, of IZA TEIXEIRA ALVES PEIXOTO and JOSE FRANCISCO HÖFLING, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 17/06/2008.</p>	
Prof. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	Prof. Jacks Jorge Júnior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</p>	

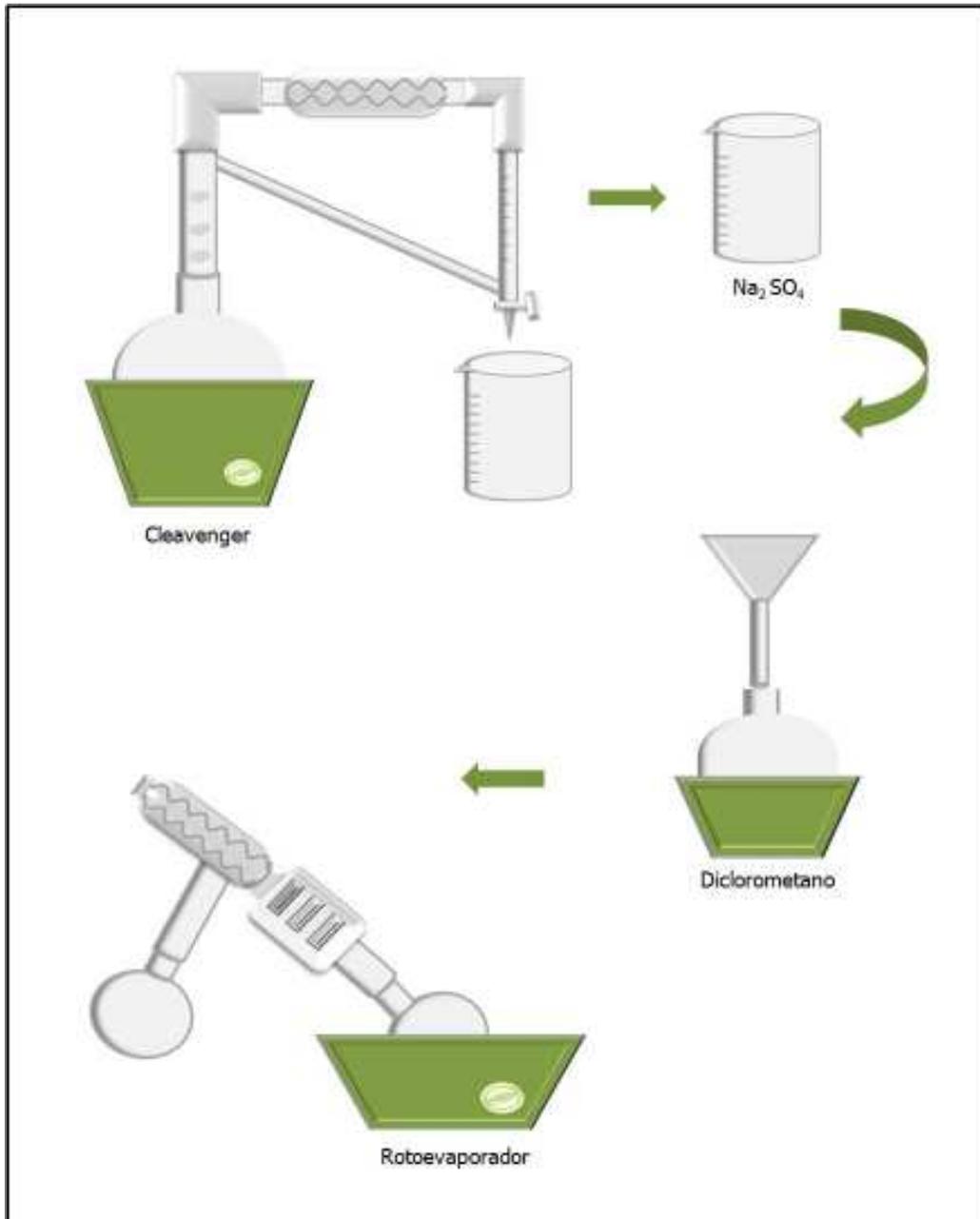
Anexo III

Estufa para cultivo dos 64 acessos de *Mentha* da CPMA do CPQBA/UNICAMP



Anexo IV

Esquema de Extração do Óleo Essencial



Anexo V

Composição dos Meios de Cultura Utilizados

RPMI- 1640 (meio para testes de susceptibilidade aos antifúngicos)

L-glutamina	46,5 g
Glicose	20 g
Água destilada	1000 mL
Ácido morfolinopropanosulfônico	0,165 M

Ausência de bicarbonato de sódio

Esterilizado por filtração em filtro biológico

Para os testes realizados em biofilme foi utilizado 8 g de MOPS (ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfônico) para 250 mL de meio RPMI-1640.

Ágar Sabouraud Dextrose

Peptona	10 g
Glucose	40 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Yeast Peptone Dextrose (YPD)

Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Glicose	20 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Yeast Peptone Dextrose com glicerol (YPD-glicerol)

Yeast Peptone Dextrose	700 mL
Glicerol	300 mL

Autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Anexo VI

Cepas	Coleção de <i>Mentha</i> (CM)																																				
	01	02	03	04	05	06	08	09	10	11	13	16	17	18	19	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37					
<i>C.a.</i> 3A5	*	*	*	*	0,031	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,046	*	1,000	0,500	*	*	*	*	*	*	*	*			
<i>C.a.</i> 13A5	*	*	*	*	0,015	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,187	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,000	0,500	*	*	*	*	*	*	< 0,007	*			
<i>C.a.</i> 15A5	*	*	*	*	0,031	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,000	0,500	*	*	*	*	*	*	1,000	*			
<i>C.a.</i> 47A5	*	*	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,000	0,500	*	*	*	*	*	*	1,000	*			
<i>C.a.</i> CBS	*	*	*	*	< 0,007	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1,000	0,500	*	*	*	*	*	*	0,250	*			
<i>C.d.</i> 26A4	*	*	*	*	0,187	*	*	*	*	*	*	*	0,250	*	1,000	*	*	0,500	*	*	1,000	*	*	0,062	0,046	*	*	0,187	0,125	*	0,125	0,187	*				
<i>C.d.</i> 26A3	*	*	*	*	< 0,007	*	*	*	*	*	*	*	0,250	*	*	*	*	1,000	*	*	*	*	*	0,125	0,062	*	*	*	*	*	*	0,250	*				
<i>C.d.</i> 26A2	*	*	*	*	0,031	*	*	*	*	*	*	*	0,500	*	1,000	*	*	1,000	*	*	*	*	*	0,125	0,125	*	*	1,000	*	*	0,250	*					
<i>C.d.</i> CBS	*	*	*	*	0,031	*	*	*	*	*	*	*	0,187	*	0,312	*	*	0,500	*	*	1,000	*	*	0,062	0,062	*	*	0,750	0,750	*	0,312	1,000	*				
	38	39	40	41	43	44	45	46	47	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	72					
<i>C.a.</i> 3A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,125	0,500	*	*	*	0,125	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	< 0,007	0,015				
<i>C.a.</i> 13A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,500	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,031	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.a.</i> 15A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,500	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
<i>C.a.</i> 47A5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,500	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.a.</i> CBS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,250	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,046	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.d.</i> 26A4	0,500	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,062	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.d.</i> 26A3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,062	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	< 0,007	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.d.</i> 26A2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*				
<i>C.d.</i> CBS	*	*	*	*	*	*	*	0,750	*	*	*	*	0,062	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0,125	*	*	*	*	*	*	*	*				

C. a. = *C. albicans*; *C. d.* = *C. dubliniensis*. * = MIC > 1 mg/mL

Tabela 10. CIM dos óleos essenciais de *Mentha* spp. (mg/mL) testado em células planctônicas de *Candida* spp. e isolados clínicos.

Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário e ao local de procedência, sendo bolsa periodontal (A). A sigla CBS representa o banco de microrganismos dos quais as espécies acima citadas foram retiradas.

Anexo VII

Tabela 11. CIM de Nistatina ($\mu\text{g/mL}$) testado em células planctônicas de *Candida* spp.

	CIM de Nistatina ($\mu\text{g/mL}$)								
<i>Candida</i> spp.	CBS 562	3 A5	13 A5	15 A5	47 A5	CBS 7987	26 A4	26 A3	26 A2
CIM	5,2	5,2	5,2	7,8	6,5	6,5	3,9	5,2	7,8