

Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*

Bruno Mello de MATOS^a, Edson Yukio KOMIYAMA^a, Ivan BALDUCCI^b,
Cristiane Yumi KOGA-ITO^a

^aDepartamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia,
Universidade Estadual Paulista – UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

^bDepartamento de Odontologia Social e Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia,
Universidade Estadual Paulista – UNESP, 12245-000 São José dos Campos - SP, Brasil

Matos BM, Komiyama EY, Balducci I, Koga-Ito CY. Antifungal activity of *Mentha piperita* alcoholic extract on *Candida albicans* and *C. tropicalis*. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(4); 244-48.

Resumo: O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antifúngica do extrato alcoólico de hortelã sobre *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Incluíram-se no estudo *C. albicans* (ATCC 18804, ATCC 36802 e 20 isolados clínicos) e *C. tropicalis* (ATCC 13803 e 20 isolados clínicos) e foram realizados testes de *screening* com cepas padrão de *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). O extrato de hortelã foi testado frente às amostras de *Candida spp.* pelo método de microdiluição. Inicialmente, realizou-se diluição seriada do extrato de hortelã em caldo RPMI, utilizando placas de microtitulação; nestas, inocularam-se suspensões padronizadas contendo 10^6 células. mL⁻¹ de cada cepa a ser avaliada e foi incluído também um grupo controle do veículo (álcool). Os testes foram realizados em duplicata, as placas incubadas a 37 °C por 24 horas, e a leitura realizada em leitor de microplacas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A seguir, determinou-se a concentração fungicida mínima (CFM) por meio da semeadura do conteúdo de cada poço da microplaca em ágar Sabouraud dextrose. Os resultados mostraram ação do extrato de hortelã (CIM e CFM) sobre *C. albicans* ($p = 0,00001$), mas não sobre *C. tropicalis* [$p = 0,5296$ (CIM) e $p = 0,6504$ (CFM)]. O extrato de hortelã apresentou ação superior sobre *C. albicans* quando comparada à *C. tropicalis*, $p = 0,00001$ (CIM e CFM). Concluiu-se que o extrato de hortelã apresentou atividade inibitória e fungicida sobre as amostras de *C. albicans* avaliadas.

Palavras-chave: Antifúngicos; *Candida*; fitoterapia; *Mentha piperita*.

Abstract: The aim of the study was evaluate the antifungal activity of the peppermint alcoholic extract on *Candida albicans* and *C. tropicalis*. It was included in the study *C. albicans* (ATCC 18804, ATCC 36802 and 20 clinical isolates) and *C. tropicalis* (ATCC 13803 and 20 clinical isolates), and performed screening tests with *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. parapsilosis* (ATCC 22019). The peppermint extract was evaluated on *Candida spp.* by microdilution method. Firstly, it was performed serial dilutions of the extract into RPMI broth in microdilution plates where was inoculated standardized suspensions with 10^6 cells/ml of each strain to be evaluated, and a control group (alcohol) was also included. The tests were made in duplicate, the plates were incubated at 37 °C/24 hours and the reading was performed in a microplates reader to determine the minimal inhibition concentration (MIC). Following, the minimal fungicide concentration (MFC) was determined by plating the content of each well of the microplate on Sabouraud dextrose agar. The results showed activity of the peppermint extract (MIC and MFC) on *C. albicans* ($p = 0.00001$), but not on *C. tropicalis*, $p = 0.5296$ (MIC) and $p = 0.6504$ (MFC). The peppermint extract showed higher activity on *C. albicans* when it was compared with *C. tropicalis*, $p = 0.00001$ (MIC and MFC). We concluded that the peppermint extract showed inhibitory and fungicide activity on the *C. albicans* strains tested.

Keywords: Antifungal agents; *Candida*; phytotherapy; *Mentha piperita*.

Introdução

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas microrganismos oportunistas que podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por longo período de tempo.¹⁻³ *Candida albicans* é o principal patógeno de origem fúngica responsável pela maioria das infecções nosocomiais.⁴

Alguns fatores locais e sistêmicos podem predispor a ocorrência da candidose bucal, como imunocomprometimento, xerostomia, alterações hormonais, uso de aparelhos ortodônticos, próteses totais e pacientes sob terapia antibiótica prolongada.^{3,5} Em pacientes imunocomprometidos, especialmente nos casos de AIDS, candidoses são relacionadas com níveis aumentados de mortalidade e morbidade.^{3,6} Desta forma, o controle dos níveis de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal pode ser considerado medida importante na prevenção desta patologia.

Atualmente, a busca por alternativas ao uso dos tradicionais antifúngicos recai sobre componentes há muito tempo utilizados pela medicina popular, os fitoterápicos. Segundo Magro et al.⁷, componentes naturais produzidos pelo metabolismo das plantas são potencialmente uma importante fonte de novos tipos de antifúngicos.

Os óleos essenciais têm sido usados de forma empírica para uma variedade de finalidades por muitos séculos. Na última década, estudos *in vitro* avaliaram o efeito antimicrobiano desses óleos, sendo que muitos deles provaram possuir propriedades antimicóticas.⁸

Mentha piperita ou hortelã-pimenta, planta da família *Lamiaceae*, está entre os mais populares ingredientes de alimentos e chás à base de ervas. Esta planta é utilizada como alternativa no tratamento de desordens biliares, enterites, gastrite, cólica intestinal e espasmos do ducto biliar.⁹ É relatada ainda sua utilização no combate a desordens estomacais, problemas do sono e da circulação.¹⁰ Outros autores relatam a utilização medicinal de *M. piperita* em óleos essenciais como agente antiinflamatório, antiespasmódico, antiemético e analgésico.^{8,11} Nota-se, entretanto, que *M. piperita* tem sua atividade antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica e antiviral) pouco citada na literatura.^{9,10} Também não existem relatos acerca da sua eficácia frente à *Candida não-albicans*, espécies emergentes e cada vez mais relacionadas às infecções fúngicas.³

O objetivo do estudo foi verificar a ação antifúngica do extrato de hortelã (extrato etanólico de *M. piperita*) sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*, além de estudar o *screening* de atividade antifúngica do referido extrato frente a amostras padrão de *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Material e método

Foram incluídas no estudo *Candida albicans* (ATCC 18804, ATCC 36802 e 20 isolados clínicos) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e 20 isolados clínicos); para o *screening*, *Candida dubliniensis* (NCPF 3108), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), sendo as amostras provenientes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Avaliou-se a ação do extrato alcoólico de *M. piperita* 10% (em álcool etílico de cereais 65%; Pharmaciantiga, São José dos Campos – SP), frente às leveduras pela técnica da microdiluição de acordo com Takarada et al.¹²

Inicialmente, as amostras de *Candida spp.* foram repicadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, antes da realização do experimento.

Posteriormente, foram obtidas suspensões padronizadas em 10⁶ células viáveis.mL⁻¹ em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%) pela técnica de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer (Laboroptik, Alemanha), para cada cepa a ser avaliada.

A seguir, realizaram-se diluições seriadas (50% – 0,02%) do extrato de hortelã em caldo RPMI (Inlab, São Paulo, SP) tamponado com MOPS (Sigma, St. Louis, EUA), utilizando placas de microtitulação (placas de poliestireno com 96 poços) estéreis e com tampa (TPP, Suíça). Em seguida, inocularam-se 100 µL das suspensões de cada cepa a ser avaliada. Incluíram-se um controle de crescimento e um controle de esterilidade. Os testes realizados em duplicata tiveram as placas incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, realizou-se a leitura em leitor de microplacas (Bio-Rad 3550), considerando-se a densidade óptica (DO) medida no comprimento de onda de 595 nm, de acordo com metodologia proposta por Takarada et al.¹². O valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) definido como a maior diluição em que não houve crescimento de levedura, correspondendo a DO₅₉₅ < 0,05.

A seguir, o conteúdo de cada poço da microplaca foi semeado em duplicata em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, EUA) e as placas incubadas a 37 °C por 48 horas para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A ausência de crescimento de colônias de leveduras no ágar indica a ação fungicida do extrato de hortelã.

Incluiu-se também um grupo controle do veículo (álcool etílico de cereais 65%).

Após esta etapa, determinaram-se os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ (CIM necessária para inibir o crescimento de 50 e 90% das amostras, respectivamente) e CFM₅₀ e CFM₉₀ (CFM necessária para inativar 50 e 90% das amostras, respectivamente).

Os resultados de CIM e CFM obtidos para o extrato alcoólico de hortelã e o álcool etílico de cereais 65% (controle) foram comparados estatisticamente por meio do teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Diferenças significativas entre estas concentrações sugerem efetividade do extrato de hortelã em relação ao controle.

Resultado

Os resultados mostraram ação do extrato de hortelã (CIM₉₀ e CFM₉₀) sobre *C. albicans* ($p = 0,00001$), mas não sobre *C. tropicalis* [$p = 0,5296$ (CIM₉₀) e $p = 0,6504$ (CFM₉₀)]. O extrato de hortelã apresentou ação superior sobre *C. albicans* quando comparada à *C. tropicalis* [$p = 0,00001$ (CIM₉₀ e CFM₉₀)] (Figuras 1 e 2).

Testes de *screening* com amostras padrão mostraram resultados positivos para *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), o que sugere que estudos futuros com estas espécies podem trazer resultados de interesse.

Os valores da CIM e CFM para as amostras de *Candida spp.* são apresentados nas Tabelas 1 a 5.

Discussão

Nos últimos anos, a atividade antimicrobiana de diversas plantas tem sido amplamente estudada⁹, na busca por substâncias alternativas.

O extrato de *M. piperita*, seja na forma de óleo essencial, seja de extrato alcoólico, segundo a literatura, apresenta propriedades antimicrobianas. O mentol é um importante componente presente nesses extratos e contribui para o potencial antimicrobiano dessa planta.^{11,13,14}

Estudos relatam a ação antimicrobiana de *M. piperita* sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.^{10,13,14} Segundo Rasooli et al.¹⁴, *M. piperita* apresentou acentuada atividade inibitória frente ao biofilme formado por *S. mutans*, atividade superior à clorexidina, tanto in vitro quanto in vivo. Além disso, apresentou também mínima concentração bactericida (6000 ppm) – inferior à clorexidina (8000 ppm) – sobre o mesmo microrganismo.

A escassez de informações relativas à atividade deste extrato sobre espécies de *Candida* motivou o desenvolvimento deste estudo. Para esta análise, as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* foram selecionadas por serem as mais prevalentes na cavidade bucal. Devido ao baixo percentual de isolamento a partir da cavidade bucal, não foi possível a avaliação de cepas clínicas de todas as espécies. Assim, optou-se por um estudo de *screening* com amostras padrão de *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019),

Tabela 1. Valores médios de CIM₅₀, CIM₉₀, CFM₅₀ e CFM₉₀ do extrato de hortelã e álcool frente às amostras clínicas de *C. albicans*

	CIM ₅₀ (%)	CIM ₉₀ (%)	CFM ₅₀ (%)	CFM ₉₀ (%)
Extrato de hortelã	0,36	1,50	0,75	1,50
Álcool	6,25	12,50	12,50	12,50

$p = 0,00001$ (CIM – concentração inibitória mínima e CFM – concentração fungicida mínima)

Tabela 2. Valores médios de CIM₅₀, CIM₉₀, CFM₅₀ e CFM₉₀ do extrato de hortelã e álcool frente às amostras clínicas de *C. tropicalis*

	CIM ₅₀ (%)	CIM ₉₀ (%)	CFM ₅₀ (%)	CFM ₉₀ (%)
Extrato de hortelã	1,50	3,20	3,20	6,25
Álcool	3,12	6,25	6,25	6,25

$p = 0,5296$ (CIM - concentração inibitória mínima)

$p = 0,6504$ (CFM - concentração fungicida mínima)

Tabela 3. Valores médios de CIM₅₀, CIM₉₀, CFM₅₀ e CFM₉₀ do extrato de hortelã frente às amostras clínicas de *C. albicans* e *C. tropicalis*

	CIM ₅₀ (%)	CIM ₉₀ (%)	CFM ₅₀ (%)	CFM ₉₀ (%)
<i>C. albicans</i>	0,36	1,50	0,75	1,50
<i>C. tropicalis</i>	1,50	3,20	3,20	6,25

$p = 0,00001$ (CIM – concentração inibitória mínima e CFM – concentração fungicida mínima)

Tabela 4. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) e CFM (concentração inibitória mínima) do extrato de hortelã sobre amostras-padrão de *Candida*

	CIM (%)	CFM (%)
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	0,75	0,75
<i>C. albicans</i> ATCC 36803	0,75	0,75
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3108	0,18	0,18
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	0,09	0,09
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	–	–
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,09	0,09
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	–	–

Tabela 5. Valores de CIM (concentração inibitória mínima) e CFM (concentração inibitória mínima) do álcool sobre amostras-padrão de *Candida*

	CIM (%)	CFM (%)
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	1,5	12,5
<i>C. albicans</i> ATCC 36803	1,5	12,5
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3108	6,25	12,5
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	3	12,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	12,5	12,5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	3,12	12,5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	–	–

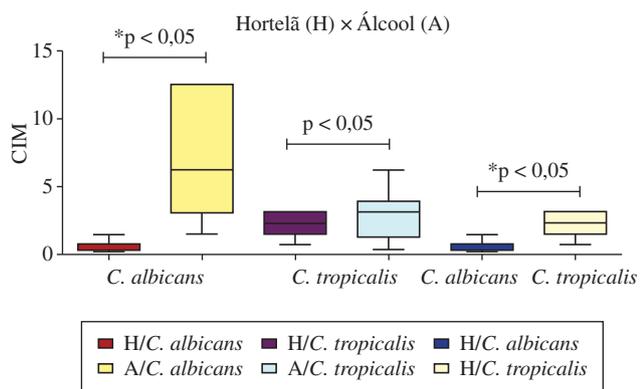


Figura 1. Médias e desvio-padrão dos valores da CIM₉₀ do extrato de hortelã e álcool sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*.

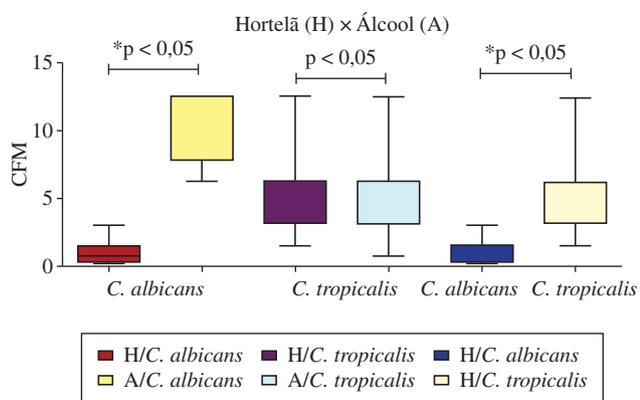


Figura 2. Médias e desvio-padrão dos valores da CFM₉₀ do extrato de hortelã e álcool sobre *C. albicans* e *C. tropicalis*.

espécies também de importância médico-odontológica, visando enriquecer os resultados. Os dados obtidos neste estudo mostraram a ação tanto fungistática quanto fungicida do extrato de hortelã não somente sobre *C. albicans* – espécie mais prevalente na cavidade bucal –, mas também sobre *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019), espécies emergentes em infecções fúngicas. Dessa forma, estudos futuros incluindo número maior de cepas clínicas de espécies não *albicans* são necessários.

Segundo a revisão de McKay, Blumberg⁹, o óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade antifúngica moderada sobre *C. albicans* e outros fungos patogênicos relevantes, concordando com os resultados de Duarte et al.⁵. Tampieri et al.⁸ verificaram uma melhor eficácia in vitro de *M. piperita* sobre *C. albicans* quando comparada com óleos essenciais de outras plantas, mesmo em concentrações maiores. Entretanto, o estudo de Iscan et al.¹¹ mostrou resultados contraditórios, pois, segundo os Autores, o óleo essencial de *M. piperita* apresentou fraca atividade antifúngica sobre

C. albicans na concentração de 5 mg.mL⁻¹ quando comparada ao controle (cetoconazol).

Este estudo mostra uma ação superior do extrato de hortelã, tanto inibitória quanto fungicida, sobre as amostras clínicas de *C. albicans* avaliadas. Estes achados estão de acordo com os relatos de Ertürk¹⁰, que afirma ainda que o extrato etanólico de *M. piperita* se apresentou mais potente frente a *C. albicans* quando comparado ao controle (nistatina): o extrato apresentou CIM de 5 mg.mL⁻¹, enquanto a nistatina apresentou CIM ≤ 12,5 mg.mL⁻¹.

No presente estudo, o extrato de hortelã não apresentou efeito adicional ao álcool de cereais 65% (controle) frente à *C. tropicalis*. Um achado interessante: a amostra padrão de *C. tropicalis* ATCC 13803 foi resistente tanto ao extrato alcoólico de hortelã como ao controle, diferindo dos padrões das demais cepas clínicas avaliadas. Não existem estudos anteriores utilizando esta espécie que permitam análises comparativas.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o extrato de hortelã apresentou atividade inibitória e fungicida sobre as amostras de *C. albicans* avaliadas.

Referências

- Dahlén G. Microbiological diagnostics in oral diseases. *Acta Odontol Scand.* 2006;64:164-8.
- Oliveira LF, Jorge AO, Santos SS. In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Braz Oral Res.* 2006;20:202-6.
- Nonaka CFW, Nascimento GJF, Goulart Filho JAV, Lima KC, Milan EP. *Candida dubliniensis* – emergent yeast associated with oral candidosis. *Rev Odontol UNESP.* 2008; 7:125-31.
- Agarwal V, Lal P, Pruthi V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia.* 2008;165:13-9.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:305-11.
- Patel M, Shackleton JA, Coogan MM, Galpin J. Antifungal effect of mouth rinses on oral *Candida* counts and salivary flow in treatment-naïve HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2008;22:613-8.
- Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. Efficacy of plant extracts against stored-products fungi. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:176-8.
- Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia.* 2005; 159:339-45.

9. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res.* 2006;20:619-33.
10. Ertürk, Ö. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia (Bratisl).* 2006;61:275-8.
11. Iscan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:3943-6.
12. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19:61-4.
13. 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;67:1249-55.
14. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SD. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytother Res.* 2008;22:1162-7.

Autor para correspondência:

Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito
cristiane@fosjc.unesp.br

Recebido: 13/03/2009

Aceito: 24/08/2009