

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIENZIMÁTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* (LAMIACEAE) PARA FOSFOLIPASE PRODUZIDA POR ISOLADOS ORAIS DE *CANDIDA ALBICANS*

BRONDANI, Lucas Pradebon<sup>1</sup>, CARVALHO, Pedro Henrique de Azambuja<sup>1</sup>, ALVES, Alessandro Menna<sup>1</sup>, PERALTA, Sonia Luque<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Oral – Faculdade de Odontologia (FOP) / UFPEL  
lucaspradebon@gmail.com

LUND, Rafael Guerra<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia Oral – FOP/UFPEL – rafael.lund@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

Dentre os microorganismos patógenos oportunistas, a *Candida albicans* vem sendo considerada como a levedura mais freqüente em infecções orais. Fato este que leva diversos clínicos e pesquisadores, a procurarem métodos para inibir ou atenuar esse tipo de infecção.

Interações entre leveduras do gênero *Candida* e as células do hospedeiro são essenciais para colonização e invasão dos tecidos e o início da doença. Estas se utilizam de uma série de artifícios, conhecidos como fatores de virulência. A espécie *C. albicans* utiliza três principais mecanismos para patogenicidade e invasão, como o escape das respostas do sistema imune (POLTERMANN et al., 2007; FROHNER et al., 2009), a mudança morfogênica de levedura para formas de hifa, o que aumenta a habilidade da levedura para aderir e invadir as células do hospedeiro (ENFERT; HUBE, 2007), e a invasão das células hospedeiras, o que é suportado pelos fatores associados às hifas, como as moléculas de adesão (FELK et al., 2002; FILLER; SHEPPARD, 2006), moléculas ‘*invasin-like*’ (PHAN et al., 2007) e enzimas hidrolíticas secretadas (SCHALLER et al., 2005).

Dentre as principais enzimas hidrolíticas produzidas, inclui-se as proteinases aspartil secretadas (Saps) e as fosfolipases (KANTARCIOGLU et al., 2002), sendo que *C. albicans* são produtoras exclusivas de fosfolipase, enzima essencial na aderência desse fungo à parede celular (BARROS et al., 2008; WILLIS et al., 2001; LYON et al., 2006).

Fosfolipases são enzimas hidrolíticas que atacam os fosfolipídeos comuns de qualquer membrana celular e está associada a capacidade de adesão da levedura ao tecido epitelial do hospedeiro. O melhor entendimento da secreção dessas exoenzimas pela *Candida albicans* e novas abordagens terapêuticas para o tratamento da candidíase visando inibir um ou mais fatores de virulência relacionados ao desencadeamento da patogenia, como a produção de exoenzimas hidrolíticas, consiste em algo extremamente interessante e inovador.

Neste estudo, é investigada a ação anti-enzimática do óleo essencial de *Origanum vulgare* (Lamiaceae) (“orégano”) que já tem sido bastante investigado por suas propriedades antimicrobianas (BARBOSA, 2010; CLEFF et al., 2010).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* anti-fosfolipase do óleo essencial de *Origanum vulgare* (“orégano”) contra isolados de *C. albicans* de pacientes com estomatite protética.

### 2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado com sete cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética e as amostras foram processadas em triplicata.

Para o teste, o óleo de *Origanum vulgare* (“orégano”) foi diluído a 1% em DMSO.

Para o preparo do inóculo, foi preparada uma suspensão de *C. albicans* repicada com 24h de antecedência em 5 ml de PBS (Tampão fosfato salino) estéril, até turbidez 0,5 na escala de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).

O óleo essencial do *O. vulgare* foi obtido por hidrodestilação em Clevenger e acondicionado até utilização em frasco escuro sob refrigeração. Para o teste, este óleo foi diluído a 1% em PBS estéril (20 µl em 1,98 ml de PBS e adicionado a 0,5 ml do inóculo).

Terminado este processo, o composto inóculo/agente foi para incubação por 30 minutos. Posteriormente, este complexo foi lavado com PBS e centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos, sendo retirado o sobrenadante. Esse processo foi repetido duas vezes e ao final o pellet foi diluído em 2 ml de PBS estéril e agitado em vórtex. Então, a suspensão foi adicionada à placa de petry com meio de fosfolipase e comparada com um controle não exposto ao agente.

O meio de fosfolipase foi preparado adicionando-se 13g de Ágar Sabouraud, 11,7g de NaCl cristalizado e 0,11g de CaCl em 180 ml de água destilada. O composto foi cozido sem ferver até adquirir coloração escura e translúcida, à 121 °C. O meio estéril foi esfriado em banho maria até temperatura morna à fria (mais ou menos 45 °C), sem endurecer, sendo adicionada, nesse momento, 7,2g de gema de ovo pura. Depois de adicionada a gema de ovo, o meio fosfolipase foi depositado em placas de petry. Os resultados foram analisados em 24, 48 e 72h, através da medição da colônia, do halo e da razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro total (colônia + halo).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os valores médios de Pz (atividade enzimática) dos isolados de *C. albicans* produtoras de fosfolipase antes e após o tratamento com o óleo de *O. vulgare*, com exceção de uma cepa que apresentou valor médio de Pz inferior após o tratamento com o óleo ( $P=0.045$ ), tendo uma redução de 70% da sua atividade enzimática.

Kadir et al. (2006) demonstraram em seu estudo que 78% dos isolados de *Candida albicans* coletadas de pacientes com estomatite protética são produtores de fosfolipase e que uma solução de digluconato de clorexidina em concentrações baixas, como: 0,002% e 0,0012% foram capazes de diminuir a produção da enzima fosfolipase, responsável pela aderência do fungo à parede celular. Sendo assim, o óleo essencial de *Origanum vulgare* (“orégano”) não teve desempenho semelhante ao da solução de clorexidina gluconada. Porém, teve efeito em alguns dos isolados de *C. albicans*, indicando que, talvez, em outras concentrações o óleo poderia apresentar efeitos semelhantes aos das soluções de clorexidina investigadas no estudo de Kadir et al. (2006).

Outro aspecto a ser considerado, é que atividade anti-enzimática sofre variações devido às características fenotípicas e genotípicas de cada cepa de *C. albicans*. Neste contexto, Price et al. (1982) encontraram em seu estudo uma variação da quantidade de fosfolipase produzida por cepas de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com estomatite, da cavidade bucal de pacientes com saúde oral e das isoladas do sangue.

Porém, Koga et al. (2006) e Willis et al. (2001) não encontraram diferença significativa na quantidade de fosfolipase produzida pelos diferentes grupos de *C. albicans* pesquisadas em seus estudos e sim no número de cepas produtoras da enzima, o que pode também ter modificado os resultados do presente trabalho.

Logo, é importante a pesquisa de compostos capazes de combater a produção de fosfolipase em leveduras, pois é comum o uso inadequado de medicamentos fungicidas, conferindo resistência desses fungos a tais compostos. Lima et al. (2006) demonstraram a capacidade de alguns óleos essenciais inibirem o crescimento de algumas espécies de *Candida*, entre elas a *C.albicans*, porém com um grau considerável de susceptibilidade, demonstrando possíveis desvantagens no uso de fungicidas em relação ao uso de compostos antienzimáticos, especialmente os antifosfolipáticos, os quais diminuiriam a virulência das cepas, possibilitando um menor número de infecções dessa natureza.

Fatores ligados ao óleo essencial também devem ser considerados, porque quando se trabalha com produtos de origem vegetal, deve-se levar em consideração as diferenças encontradas em sua composição química, visto que seus componentes químicos podem ser fatores determinantes nas suas propriedades farmacológicas, como a atividade antimicrobiana (CLEFF et al., 2010).

Os testes com o óleo de “orégano” seguem sendo realizados, pois resultados positivos para a diminuição da virulência de *C.albicans* com fitoterápicos são de interesse geral, uma vez que estes possivelmente acarretariam medicamentos com menos efeitos colaterais por serem produzidos com base em alimentos consumidos há muito pelos humanos, com pouquíssimos relatos de reações adversas.

#### 4 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo e baseado na metodologia empregada, conclui-se que o óleo essencial de “orégano” a 1% modulou a atividade de fosfolipase de apenas um isolado de *C.albicans*, suprimindo a sua patogenicidade, e que a ação do extrato pode variar para isolados da mesma espécie.

#### 5 REFERÊNCIAS

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação.** Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociencias. Botucatu: [s.n.], 2010.

BARROS, L.M. et al. Genetic diversity and exoenzyme activities of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 12, p.1172-78, 2008.

CLEFF, M. B. et al. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida species*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 116-23, 2010.

ENFERT, C.D.; HUBE, B. *Candida*: comparative and functional genomics. **Caister Academic Press**, Wymondham, Norfolk, U.K. 2007.

FELK, A. et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infection and Immunity**, USA, v. 70, p. 3689–700, 2002.

FILLER, S.G.; SHEPPARD, D.C.. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. **PLoS Pathogens**, v.2, p. 129, 2006.

FROHNER, I.E.; BOURGEOIS, C.; YATSYK, K.; MAJER, O.; KUCHLER, K. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. **Molecular Microbiology**, v. 71, p. 240–52, 2009

KADIR, T.; GUMRU, B. ; UYGUN-CAN, B. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolates from patients with denture stomatitis: The influence of chlorhexidine gluconate on phospholipase production. **Archives of Oral Biology**, v. 52, p. 691–96, 2006.

KOGA-ITO, C. Y. et al. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. **Mycopathologia**, v.161, p. 219–23, 2006.

LIMA, I. D. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 197-201, 2006.

LYON, J. P.; RESENDE, M. A. D. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 102, p. 632-38, 2006.

NEVILLE, B. W. et al. Infecções fúngicas e Protozoárias. NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 6, p. 213 –39.

PHAN, Q.T. et al. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biology**, v. 5, p. 64, 2007.

POLTERMANN, S. et al. Gpm1p is a Factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 282, p. 37537– 44, 2007.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 15, p.179–85, 1982.

SCHALLER M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-77, 2005.

WILLIS, A.M. et al. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 91, p.317–21, 2001.